



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

# **Área tegmental ventral del ratón: estudio de sus proyecciones eferentes a nivel poblacional y de célula única**

---

TESIS DOCTORAL

Ana Aransay García

Dirigida por la Doctora

Lucía Prensa Sepúlveda

Madrid, 2017

**A Dani**

**A mis Padres**

*"El buen dibujo, como la buena preparación microscópica, son pedazos de la realidad, documentos científicos que conservan indefinidamente su valor y cuya revisión será siempre provechosa, cualesquiera que sean las interpretaciones a que hayan dado origen."*

*Santiago Ramón y Cajal, 1899*

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos del BFU2010-19695 del Ministerio de Economía y Competitividad, del Human Brain Project – EU Flagship. Subproject 1: Strategic Mouse Data, de la Unión Europea, y la Fundación Eugenio Rodríguez Pascual.

Los procedimientos llevados a cabo en los animales en el transcurso de esta investigación fueron aprobados por el Comité de Ética para la Investigación de la UAM.

## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero agradecer a todas aquellas personas que han contribuido a que haya podido realizar esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero dar las gracias a la Dra. Lucía Prensa, directora de esta Tesis, por el tiempo que ha dedicado no sólo a la dirección de este trabajo sino también a la corrección de este volumen y de la publicación a la que ha dado lugar, además de a la preparación de las comunicaciones a congresos y posters. Gracias Lucía, por tu disponibilidad y cercanía incluso en tu tiempo libre y fines de semana, porque sin ella no habiéramos podido acabar esta Tesis. Tú me has enseñado las nociones básicas de la investigación en neurociencia lo que ha supuesto un gran descubrimiento para mí y una motivación para continuar con la investigación, y no restringirme al ámbito clínico, que me apasiona, ya que creo que el planteamiento científico lo complementa y potencia.

Quiero agradecer también al Dr. Francisco Clascá por toda su ayuda prestada a lo largo de este trabajo, y en especial en la elaboración del artículo, así como por haber hecho posible trabajar con los vectores. Al Dr. Takahiro Furuta y al Dr. Takeshi Kaneko (Kyoto University, Japón) por donar el vector Sindbis-pal-GFP, y al Dr. Cristian Smerdou y al Dr. José Ignacio Quetglas (CIMA, Universidad de Navarra, España) por producir las partículas virales.

Gracias a María García Amado, por su valiosa ayuda con la estereología, por enseñarme las nociones básicas y por ayudarme y supervisar las estimaciones estereológicas de esta Tesis. Gracias también, María, por tu apoyo y tus consejos durante estos años en el A-39.

Gracias a César Porrero por enseñarme a realizar las primeras cirugías con viriones y por las innumerables preguntas que me ha resuelto cuando nos encontrábamos por el pasillo.

Gracias a Claudia Rodríguez por su gran ayuda con las cirugías de ratones y la reconstrucción de los axones de las neuronas.

Gracias a Marta Callejo por enseñarme las técnicas de laboratorio, ayudarme con las cirugías y perfusiones de ratones y por su excelente procesamiento del tejido y su asistencia técnica en imagen confocal junto con Ana Isabel de las Heras.

Dani, muchísimas gracias por tu paciencia, apoyo y cariño, gracias por animarme siempre a terminar esta Tesis a pesar de quitarnos el poco tiempo que compartimos, gracias por las horas que te has pasado a mi lado mientras la escribía y gracias por solucionarme todas las cuestiones informáticas. La verdad es que no tengo palabras para poder expresarte lo que agradezco tu ayuda en este trabajo.

Gracias a mi hermana por sus consejos y por su ejemplo de mirar siempre hacia adelante y no rendirse nunca.

Gracias, Papá y Mamá, porque siempre me habéis apoyado y habéis participado pasiva y activamente, ¿Os acordáis de la impresión del DEA? Gracias por la educación que me habéis dado y sobre todo por saber transmitirme que merece la pena hacer un esfuerzo, aunque sea grande y largo, para conseguir un sueño. Sin vosotros esto no hubiera sido posible.

## RESUMEN

---

El área tegmental ventral (VTA) se caracteriza por su heterogénea parcelación citoarquitectónica, la diversidad de sus proyecciones y la riqueza bioquímica de sus neuronas, las cuales son mayormente dopaminérgicas, entremezcladas con otras menos numerosas gabaérgicas o glutamatérgicas, e incluso con neuronas que contienen combinaciones de estos neurotransmisores. Los principales sistemas de proyección del VTA son el mesocortical y mesolímbico, principalmente dopaminérgicos, cuya disfunción está implicada en la fisiopatología de la esquizofrenia y de trastornos adictivos. En esta Tesis Doctoral se han estudiado las proyecciones eferentes de subdivisiones concretas del VTA del ratón para determinar las posibles diferencias funcionales de estos territorios mesencefálicos. Para ello, se realizó un estudio poblacional de las proyecciones eferentes de varias subdivisiones del VTA usando microdepósitos de amino dextrano biotinilado y, después se llevó a cabo la transfección de 30 neuronas únicas ubicadas en distintas subdivisiones del VTA con el vector Sindbis-pal-GFP y la reconstrucción completa de sus axones, para examinar sus patrones de ramificación. En estas neuronas se analizó con microscopía confocal su fenotipo dopaminérgico usando inmunofluorescencia para la tirosina hidroxilasa y la longitud de axón de las terminaciones axonales se estimó con estereología. Según su patrón de arborización axonal se diferencian dos tipos de neuronas de VTA: las que proyectan al prosencéfalo y las que proyectan al prosencéfalo y al tronco del encéfalo. El primer tipo se divide en cuatro subtipos según sus principales dianas de innervación: neuronas mesocorticolímbicas (proyectan a la corteza cerebral y al prosencéfalo basal), neuronas mesocorticales (inervan la corteza cerebral), neuronas mesolímbicas (inervan estructuras límbicas prosencefálicas) y neuronas mesoestriadas (inervan el caudado-putamen). No se ha observado una topografía selectiva de ninguno de estos tipos neuronales en las subdivisiones de VTA estudiadas. La diversidad de conexiones del VTA y la riqueza de las arborizaciones axonales de sus neuronas demostradas en esta Tesis Doctoral es consistente con el hecho de que neuronas del VTA modulan la actividad de grupos específicos de estructuras prosencefálicas y troncoencefálicas.

## ABSTRACT

---

The Ventral Tegmental Area (VTA) is characterized by its heterogeneous cytoarchitectonic subdivisions, the diversity of its projections and the biochemical variety of its neurons, which are mostly dopaminergic, mixed with other, less numerous, gabaergic or glutamatergic ones, and even with neurons that contain several of these neurotransmitters. The main projection systems of the VTA are the mesocortical and the mesolimbic ones, largely dopaminergic, the dysfunction of which is involved in the pathophysiology of schizophrenia and addictive behaviors. In this Doctoral Thesis, we have studied in the mouse the efferent projections of specific subdivisions of the VTA, to determine the possible functional diversity of these VTA mesencephalic territories. For this purpose, the axons of small populations of VTA cells were labeled with iontophoretic microdeposits of biotinylated dextran amine, and then the axons of 30 VTA single neurons located in different VTA subdivisions were labeled and analyzed by means of single-cell transfection with the Sindbis-pal-GFP vector to define their patterns of branching. The dopaminergic phenotype of these single-labeled neurons was tested by double-labeling for tyrosine hydroxylase immunofluorescence and the length of terminal axonal arbors was estimated by stereology. Depending on their axonal branching pattern, two main, markedly different VTA cell morphologies were observed: 1. neurons with a single main axon targeting only forebrain structures, and 2. neurons with multibranched axons targeting both the forebrain and the brainstem. Moreover, four “subtypes” could be distinguished among the first type of neurons based on their projection targets: mesocorticolimbic neurons (projecting to neocortex and basal forebrain), mesocortical neurons (innervating the neocortex), mesolimbic neurons (innervating forebrain limbic structures), and mesostriatal neurons (targeting caudate-putamen). None of the neuronal types described in this study on the basis of their axonal branching patterns is distributed in a manner that correlates with the VTA subdivisions analyzed here. The observed diversity in the connections and in the wiring architectures of the VTA neurons, demonstrated in this Doctoral Thesis, is consistent with the notion that different VTA cell subpopulations modulate the activity of specific sets of prosencephalic and brainstem structures.



## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
3V	III ventrículo
4V	IV ventrículo
A	complejo amigdalino
AAV	área amigdalina anterior, parte ventral
ac	comisura anterior
Acb	núcleo accumbens
AcbC	región <i>core</i> del núcleo accumbens
AcbSh	región <i>shell</i> del núcleo accumbens
ACo	área amigdalina cortical anterior
AHA	área hipotalámica anterior
AHC	área hipotalámica anterior , parte central
AHP	área hipotalámica anterior, parte posterior
AI	corteza insular agranular
AID	corteza insular agranular dorsal
AIV	corteza insular agranular ventral
AM	núcleo talámico anteromedial
AO	área olfatoria anterior
AOM	área olfatoria anterior, parte medial
AOP	área olfatoria anterior, parte posterior
AOV	área olfatoria anterior, parte ventral
APT	núcleo pretectal anterior
AStr	área de transición amigdaloesfria
B	núcleo basal de Meynert
BDA	aminodextrano biotinilado
BL	núcleo amigdalino basolateral
BLA	núcleo amigdalino basolateral, parte anterior
BM	núcleo amigdalino basomedial
BMP	núcleo amigdalino basomedial, parte posterior
BST	núcleo del lecho de la estría terminal
BSTL	núcleo del lecho de la estría terminal, división lateral
BSTLD	núcleo del lecho de la estría terminal, división lateral, parte dorsal
BSTLP	núcleo del lecho de la estría terminal, división lateral, parte posterior
BSTLV	núcleo del lecho de la estría terminal, división lateral, parte ventral

Abreviatura	Descripción
C	caudal
cc	cuerpo calloso
Ce	núcleo amigdalino central
CeC	núcleo amigdalino central, parte capsular
CeL	núcleo amigdalino central, división lateral
CeM	núcleo amigdalino central, división medial
Cg	corteza cingular
Cg1	corteza cingular, área 1
Cg2	corteza cingular, área 2
Cl	claustró
CLi	núcleo caudal lineal
CM	núcleo talámico central medial
Co	núcleo amigdalino cortical
cp	pedúnculo cerebral
CPF	corteza prefrontal
CPu	caudado-putamen
D	dorsal
DA	dopamina
DBB	banda diagonal de Broca
DEn	núcleo endopiriforme dorsal
DP	corteza dorsal peduncular
DpG	capa gris profunda del cóliculo superior
DpMe	núcleo mesencefálico profundo
DR	núcleo dorsal del rafe
DRD	núcleo dorsal del rafe, parte dorsal
DRV	núcleo dorsal del rafe, parte ventral
DTg	núcleo tegmental dorsal
DTgP	núcleo tegmental dorsal, parte pericentral
DTT	tenia tecta dorsal
f	fórnix
fi	fimbria del hipocampo
fr	fascículo retrorreflejo
FrA	corteza frontal de asociación
GABA	ácido γ-aminobutírico
GAD	descarboxilasa del ácido glutámico
GFP	proteína verde fluorescente
GI	corteza insular granular
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	agua destilada

Abreviatura	Descripción
HDB	núcleo del brazo horizontal de la banda diagonal de Broca
HRP	peroxidasa del rábano
ic	cápsula interna
ICj	islas de Calleja
IF	núcleo interfascicular
IP	núcleo interpeduncular
IPAC	núcleo intersticial del brazo posterior de la comisura anterior
IPL	núcleo interpeduncular, subnúcleo lateral
LC	<i>locus coeruleus</i>
LDTg	núcleo tegmental laterodorsal
LEnt	corteza entorrinal lateral
LGP	globo pálido lateral
LH	área hipotalámica lateral
LHb	núcleo habenular lateral
LHbM	núcleo habenular lateral, parte medial
LO	corteza orbitaria lateral
LPAG	sustancia gris periacueductal lateral
LPO	área preóptica lateral
LS	núcleo septal lateral
LSD	núcleo septal lateral, parte dorsal
LSI	núcleo septal lateral, parte intermedia
LSS	banda lateral del estriado
LSV	núcleo septal lateral, parte ventral
LV	ventrículo lateral
M1	corteza motora primaria
M2	corteza motora secundaria
MCLH	núcleo magnocelular del hipotálamo lateral
MCPO	núcleo preóptico magnocelular
MD	núcleo talámico mediodorsal
MDL	núcleo talámico mediodorsal, parte lateral
MDM	núcleo talámico mediodorsal, parte medial
Me	núcleo amigdalino medial
MeAD	núcleo amigdalino medial, parte anterodorsal
MEnt	corteza entorrinal medial
MHb	núcleo habenular medial
ml	lemnisco medial
ML	núcleo mamilar medial, parte lateral
MM	núcleo mamilar medial, parte medial

Abreviatura	Descripción
MnR	núcleo mediano del rafe
MO	corteza orbitaria medial
MPT	núcleo pretectal medial
MS	núcleo septal medial
mt	tracto mamilotalámico
NGS	suero normal de cabra
PAG	sustancia gris periacueductal
pal-GFP	proteína verde fluorescente fusionada con la señal de palmitoilación
Pap	núcleo parapeduncular
PB	tampón fosfato
PBP	núcleo parabraquial pigmentado
PBS	tampón fosfato salino
PCom	núcleo de la comisura posterior
PFR	área parafascicular retrorrefleja
PH	área hipotalámica posterior
PIF	núcleo parainterfascicular
Pir	corteza piriforme
PMCo	área amigdalina cortical posteromedial
PMnR	núcleo del rafe paramediano
PN	núcleo paranigral
Pn	núcleos pontinos
PnO	parte oral del núcleo reticular pontino
PRh	corteza perirrinal
PrL	prelímica
PTg	núcleo pedunculotegmental
PV	núcleo talámico paraventricular
PVG	sustancia gris periventricular
PVP	núcleo talámico paraventricular, parte posterior
Re	núcleo talámico reuniens
Rh	núcleo talámico romboidal
RI	núcleo intersticial rostral
RLi	núcleo rostral linear
RM	núcleo retromamilar
RMTg	núcleo tegmental rostromedial
RN	núcleo rojo
RRF	campo retrorrubral
RSA	corteza retroesplénica agranular
RSG	corteza retroesplénica granular

Abreviatura	Descripción
Rt	núcleo talámico reticular
RtTg	núcleo tegmental reticulopontino
rVTA	región rostral del área tegmental ventral
S1	corteza somatosensorial primaria
S2	corteza somatosensorial secundaria
scp	pedúnculo cerebeloso superior
SI	sustancia innominada
sm	estría medular
SNC	sustancia negra, parte compacta
SNR	sustancia negra, parte reticular
STh	núcleo subtalámico
Sub	núcleo talámico submedius
SuMM	núcleo supramamilar, parte medial
TH	tirosina hidroxilasa
TH+	tirosina hidroxilasa positivo
Tu	tubérculo olfatorio
tVTA	cola del área tegmental ventral
VDB	núcleo del brazo vertical de la banda diagonal de Broca
VEn	núcleo endopiriforme ventral
vGluT2	transportador vesicular de glutamato tipo 2
VLPAG	sustancia gris periacueductal ventrolateral
VO	corteza orbitaria ventral
VP	pálido ventral
VTA	área tegmental ventral
VTt	tenia tecta ventral
VTT	cola del área tegmental ventral
ZI	zona incerta

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Parcelación nuclear del VTA de la rata .....	12
<b>Figura 2.</b> Parcelación del VTA de ratón en base al contenido en neuronas tirosina hidroxilasa positivas y Nissl .....	13
<b>Figura 3.</b> Morfología de células dopaminérgicas de los grupos A8 y A10 .....	17
<b>Figura 4.</b> Distribución de las poblaciones de neuronas neuroquímicamente definidas del VTA.....	20
<b>Figura 5.</b> Distribución de las neuronas de VTA que expresan tirosina hidroxilasa (TH) o mRNA del transportador vesicular de glutamato de tipo 2 (vGluT2).....	21
<b>Figura 6.</b> Organización ultraestructural de las sinapsis de neuronas de proyección del VTA en el núcleo accumbens.....	29
<b>Figura 7.</b> Proyecciones aferentes a las neuronas dopaminérgicas del VTA confirmadas a nivel sináptico .....	37
<b>Figura 8.</b> Proyecciones aferentes y eferentes observadas a nivel sináptico de neuronas dopaminérgicas del VTA implicadas en los mecanismos de recompensa y aversión ....	39
<b>Figura 9.</b> Localización del VTA y sus coordenadas estereotácticas en el encéfalo de ratón .....	48
<b>Figura 10.</b> Inmunorreactividad frente a la GFP después de la inyección del vector viral Sindbis-pal-GFP .....	52
<b>Figura 11.</b> Inmunorreactividad frente a la TH de los somas neuronales de VTA infectados por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP .....	58
<b>Figura 12.</b> Neurona de VTA infectada por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP que no expresa la TH y está localizada entre numerosas neuronas dopaminérgicas (TH+) del VTA .....	59
<b>Figura 13.</b> Depósito de BDA localizado en PBP .....	65
<b>Figura 14.</b> Localización de los somas neuronales infectados por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP en las subdivisiones del VTA, delimitadas por su inmunorreactividad frente a TH .....	67
<b>Figura 15.</b> Planos virtuales isotrópicos.....	70
<b>Figura 16.</b> Intersecciones de fibras nerviosas con planos virtuales .....	71
<b>Figura 17.</b> Delimitación de las subdivisiones del VTA .....	76
<b>Figura 18.</b> Localización de los microdepósitos de BDA .....	78

<b>Figura 19.</b> Morfología de las fibras de los campos terminales marcados con BDA .....	81
<b>Figura 20.</b> Microdepósito de BDA localizado en PBP y sus campos terminales.....	82
<b>Figura 21.</b> Microdepósito de BDA localizado en PN y campo axonal terminal marcado a partir del mismo .....	85
<b>Figura 22.</b> Neuronas mesocorticolímbicas .....	91
<b>Figura 23.</b> Neuronas mesocorticales .....	93
<b>Figura 24.</b> Neuronas mesolímbicas .....	96
<b>Figura 25.</b> Neurona mesoestriada .....	98
<b>Figura 26.</b> Neurona de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo .....	101
<b>Figura 27.</b> Morfología de fibras terminales dopaminérgicas y no dopaminérgicas ....	102
<b>Figura 28.</b> Tipos de neuronas de proyección del VTA y su localización topográfica ...	106
<b>Figura 29.</b> Representación esquemática de la teoría de la disfunción dopaminérgica en la esquizofrenia.....	131

## LISTA DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Parcelación nuclear del VTA realizada en estudios previos y su relación con la definición del grupo A10 .....	14
<b>Tabla 2.</b> Proyecciones eferentes del VTA.....	31
<b>Tabla 3.</b> Proyecciones aferentes del VTA .....	40
<b>Tabla 4.</b> Neuronas del VTA infectadas por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP y reconstruidas en cada animal.....	68
<b>Tabla 5.</b> Parámetros estereológicos para la estimación de la longitud de axón (L) de los campos axonales terminales de cuatro neuronas del VTA .....	73
<b>Tabla 6.</b> Microdepósitos de BDA analizados en este estudio .....	79
<b>Tabla 7.</b> Estructuras cerebrales inervadas por cada uno de los microdepósitos de BDA ubicados en PBP y su intensidad de inervación .....	84
<b>Tabla 8.</b> Estructuras cerebrales inervadas por cada uno de los dos microdepósitos de BDA ubicados en PN y su intensidad de inervación .....	86
<b>Tabla 9.</b> Tipos de neuronas de proyección del VTA .....	103
<b>Tabla 10.</b> Longitud de axón de los campos terminales marcados a partir de neuronas individuales del VTA .....	105

## LISTA DE SOLUCIONES

---

<b>Solución 1.</b> BDA al 3% en acetato potásico 0,5M .....	50
<b>Solución 2.</b> Dolethal .....	53
<b>Solución 3.</b> Paraformaldehído (PAF) al 4% en PB.....	53
<b>Solución 4.</b> Sacarosa al 30% .....	54
<b>Solución 5.</b> PB 0,2M, pH 7,4 .....	54
<b>Solución 6.</b> PB 0,4M, pH 7,4 .....	54
<b>Solución 7.</b> Tampón fosfato salino 0,1M, pH 7,4 .....	55
<b>Solución 8.</b> Solución de inactivación de peroxidasa endógena .....	55
<b>Solución 9.</b> Complejo Avidina-Biotina, solución de ABC Elite .....	55
<b>Solución 10.</b> Tampón de Tris-HCl, 0,05M, pH 7,6 .....	55
<b>Solución 11.</b> Solución de revelado con níquel-diaminobenzidina .....	55
<b>Solución 12.</b> Solución de incubación.....	63
<b>Solución 13.</b> Solución de revelado .....	63

# ÍNDICE

---

AGRADECIMIENTOS.....	V
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT .....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABLAS.....	XIV
LISTA DE SOLUCIONES .....	XV
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 DEFINICIÓN Y ORGANIZACIÓN NUCLEAR DEL VTA.....	2
1.1.1 Definición del VTA .....	2
1.1.2 Organización nuclear del VTA.....	4
1.2 POBLACIONES NEURONALES DEL VTA.....	15
1.2.1 Arquitectura celular del VTA.....	15
1.2.2 Poblaciones neuronales caracterizadas neuroquímicamente .....	18
1.3 PROYECCIONES EFERENTES DEL VTA.....	21
1.4 PROYECCIONES AFERENTES AL VTA .....	32
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS .....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	46
3.2 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO .....	46
3.2.1 Microdepósitos de BDA .....	48
3.2.2 Inyección del vector viral Sindbis-pal-GFP.....	50
3.3 FIJACIÓN DE LOS CEREBROS POR PERFUSIÓN TRANSCARDÍACA .....	51
3.4 PROCESAMIENTO DE LOS CEREBROS .....	54
3.4.1 Cerebros con microdepósitos de BDA.....	54



3.4.2 Cerebros con vectores Sindbis-pal-GFP .....	56
3.5 TINCIONES PARA LA DELIMITACIÓN NEUROQUÍMICA DE LAS SUBDIVISIONES DEL VTA EN RATONES .....	60
3.5.1 Inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa .....	61
3.5.2 Tinción de Nissl .....	61
3.5.3 Tinción de acetilcolinesterasa (AChE).....	62
3.6 ANÁLISIS DEL MATERIAL .....	63
3.6.1 Delimitación neuroquímica de las subdivisiones del VTA .....	63
3.6.2 Localización de los microdepósitos de BDA y de los campos terminales ...	64
3.6.3 Localización de las neuronas que expresan pal-GFP, determinación de su naturaleza dopaminérgica y trazado de sus axones.....	65
3.6.4 Estimación de la longitud de axón presente en los campos terminales proporcionados por neuronas individuales.....	69
RESULTADOS.....	74
4.1 DELIMITACIÓN DE LAS SUBDIVISIONES DEL VTA EN EL RATÓN .....	75
4.2 ESTUDIO POBLACIONAL DE LAS PROYECCIONES EFERENTES DE LAS SUBDIVISIONES PBP Y PN DEL VTA .....	77
4.2.1 Proyecciones eferentes del PBP .....	80
4.2.2 Proyecciones eferentes de neuronas del PN.....	85
4.3 PATRÓN DE ARBORIZACIÓN AXONAL DE NEURONAS INDIVIDUALES SITUADAS EN VARIAS SUBDIVISIONES DEL VTA .....	86
4.3.1 Neuronas de proyección al prosencéfalo .....	88
4.3.2 Neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo .....	99
4.4 COMPARACIÓN DE LA LONGITUD DE AXÓN DE LOS CAMPOS TERMINALES PROPORCIONADOS POR DIFERENTES TIPOS DE NEURONAS DEL VTA.....	104
DISCUSIÓN .....	107
5.1 CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS .....	109

5.1.1 Subdivisiones del VTA.....	109
5.1.2 Visualización del fenotipo dopaminérgico de las neuronas infectadas por el vector Sindbis-pal-GFP.....	111
5.2 PROYECCIONES EFERENTES DEL VTA.....	113
5.2.1 Proyecciones a la corteza cerebral .....	113
5.2.2 Proyecciones a la amígdala, hipocampo, núcleos septales y banda diagonal de Broca .....	115
5.2.3 Proyecciones al estriado ventral y dorsal .....	116
5.2.4 Proyecciones al tálamo y al epitálamo .....	118
5.2.5 Proyecciones al hipotálamo y a la sustancia gris periacueductal.....	120
5.2.6 Proyecciones al tronco del encéfalo.....	122
5.3 DIVERSIDAD DE NEURONAS DE PROYECCIÓN DEL VTA.....	123
5.3.1 Neuronas de proyección al prosencéfalo .....	125
5.3.2 Neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo .....	130
CONCLUSIONES.....	132
BIBLIOGRAFÍA .....	135

## **INTRODUCCIÓN**

---

## 1.1 DEFINICIÓN Y ORGANIZACIÓN NUCLEAR DEL VTA

El área tegmental ventral (VTA; abreviatura tomada de su nombre inglés *ventral tegmental area*) comprende un grupo numeroso de neuronas situado en la región ventral del mesencéfalo y es un territorio caracterizado por la heterogeneidad de su citoarquitectura y de sus proyecciones. Esta región limita rostralmente con los cuerpos mamilares del hipotálamo, dorsolateralmente con el núcleo rojo (RN) y las fibras del nervio craneal oculomotor, caudalmente con la protuberancia y lateralmente con la sustancia negra.

Las neuronas del VTA dan lugar a abundantes proyecciones hacia estructuras corticales y subcorticales, las cuales constituyen el sistema mesocorticolímbico que interviene en procesos de motivación, recompensa cerebral, procesamiento emocional de la información sensorial, aprendizaje y memoria (Laviollete, 2007), y cuya disfunción se relaciona con enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia (Sesack y Carr, 2002; Laviollete, 2007; Lau y cols., 2013), la depresión mayor (Nestler y Carlezon, 2007; Friedman y cols., 2009; Russo y Nestler, 2013) o la adicción a drogas (Berridge y Robinson, 1998; Wise, 1978, 2002, 2009; Salome y Correa, 2002; Ungless, 2004; Corominas-Roso y cols., 2007; Arias-Carrión y cols., 2010; Pitchers y cols., 2014; Ranaldi, 2014). El conocimiento detallado de la morfología y fisiología de las neuronas del VTA es fundamental para poder comprender la fisiopatología de dichas enfermedades psiquiátricas.

### 1.1.1 Definición del VTA

El VTA fue descrita por primera vez como entidad morfológica en el *opossum* por Tsai, quien la denominó núcleo tegmental ventral (Tsai, 1925). Hasta entonces dicha región se consideraba una parte de la sustancia negra (Kosaka e Hiraiwa, 1915; Castaldi, 1923), pero Tsai afirmó que el núcleo tegmental ventral estaba separado de ésta por un espacio libre de células, que sus neuronas eran morfológicamente diferentes a las de la sustancia negra y que, además, inervaba el tubérculo olfatorio (Tu), a diferencia de la sustancia negra, por lo que se debía considerar una estructura con entidad propia. El término de área tegmental ventral fue utilizado por primera vez por Bodian en 1940

quien estudiando en el perro esta región observó la heterogeneidad de su citoarquitectura y la ausencia de claros límites que la separen de las estructuras adyacentes. Posteriormente, Nauta observó que estructuras relacionadas con el sistema límbico, como el área hipotalámica lateral (LH), proyectaban al mesencéfalo medial, incluyendo el VTA pero no a la sustancia negra, reafirmando así la distinción entre ambas (Nauta y cols., 1956; Nauta, 1958, 1960).

En 1964, Dahlström y Fuxe localizaron en el cerebro de la rata los grupos de células catecolaminérgicas, que como no se confinaban a estructuras definidas citoarquitectónicamente los denominaron como grupos A1- A12 distribuidos desde el bulbo raquídeo al hipotálamo de la rata. Estudios posteriores describieron cinco grupos celulares más, grupos A13–A17, localizados en el diencefalo, el bulbo olfatorio y la retina (Hökfelt y cols., 1984). Los grupos celulares A8, A9 y A10 se localizan en el mesencéfalo ventral y contienen neuronas dopaminérgicas. El grupo A8 se localiza en el campo o área retrorubral (RRF), el A9 en la sustancia negra y el A10 en el VTA, diferenciándose este último de los otros dos por sus conexiones con el sistema límbico.

Inicialmente se consideró el VTA como sinónimo de grupo A10 (Dahlström y Fuxe, 1964; Fallon y Moore, 1978; Moore y Bloom, 1978; véase la **Tabla 1**). Sin embargo, este concepto de A10 se fue modificando a medida que se identificaron nuevos grupos dopaminérgicos, como los descritos por Hökfelt y cols. (1984) en el núcleo supramamilar, la habénula medial (MHb), el núcleo dorsal del rafe (DR) y en la sustancia gris periacueductal (PAG). Hökfelt y cols. (1984) incluyeron estos grupos dopaminérgicos dentro del A10 pero este concepto extendido de A10 no fue aceptado ampliamente (Ikemoto, 2007). Los estudios posteriores que han demostrado la coexistencia dentro del VTA de grupos neuronales gabaérgicos (Oertel y cols., 1982; Nagai y cols., 1983; Olson y Nestler, 2007) y glutamatérgicos (Hur y Zaborszky, 2005; Kawano y cols., 2006; Nair-Roberts y cols., 2008; Morales y Root, 2014; Root y cols., 2014a, b; Bariselli y cols., 2016) han dejado claro que no pueden considerarse VTA y A10 estructuras equiparables. Actualmente, el VTA se considera una región medial del mesencéfalo ventral compuesta por un grupo de neuronas dopaminérgicas que componen el grupo A10, que coexisten con otras poblaciones menos numerosas de neuronas gabaérgicas y glutamatérgicas, y dan lugar a amplias proyecciones a regiones corticales y subcorticales. El VTA incluye

diversos núcleos con características citoarquitectónicas particulares, tal y como se detalla en el apartado 1.1.2.

Algunos autores también incluyeron dentro del grupo A10, el núcleo interpeduncular (IP) (Mulder y Snyder, 1976; Kemali, 1977). Este núcleo es impar y se localiza en la línea media a nivel de la base del tegmento mesencefálico, entre ambos pedúnculos cerebrales, y limita dorsalmente con el VTA y rostralmente con los cuerpos mamilares. Mulder y Snyder (1976) consideraron a este grupo el origen de las vías dopaminérgicas del sistema mesolímbico que proyectan a estructuras límbicas del prosencéfalo. Además de la dopamina, en el IP se han identificado otros neurotransmisores como la serotonina (Saavedra y cols., 1974), otras catecolaminas como la noradrenalina (Fuxe, 1965; Hamil y cols., 1984) y la sustancia P (Hökfelt y cols., 1975); razones por las que actualmente no se considera el IP parte del grupo A10.

### **1.1.2 Organización nuclear del VTA**

De acuerdo con criterios citoarquitectónicos se han distinguido hasta ocho núcleos o subdivisiones dentro del VTA: núcleo parabraquial pigmentado (PBP), núcleo paranigral (PN), núcleo parainterfascicular (PIF), área tegmental ventral rostral (rVTA), cola tegmental ventral (VTT), núcleo interfascicular (IF), núcleo rostral linear (RLi) y núcleo caudal linear (CLi) (Halliday y Törk, 1986; Oades y Halliday, 1987; Ikemoto, 2007; Paxinos y Watson, 2007; Franklin y Paxinos, 2007; Ferreira y cols., 2008; Fu y cols., 2012). Sin embargo, la inclusión de estas ocho subdivisiones dentro del VTA y la definición de sus límites no ha sido consistente en los diversos estudios existentes en la bibliografía, y la discrepancia en los criterios de demarcación de las subdivisiones del VTA se hace especialmente llamativa cuando se trata de investigaciones realizadas en especies distintas, existiendo todavía hoy en día cierta controversia sobre las subdivisiones del VTA y sus delimitaciones (**Tabla 1**).

Las primeras subdivisiones del VTA fueron descritas en el año 1954 por Olszewski y Baxter, quienes usando secciones teñidas con Nissl estudiaron el tronco del encéfalo humano e identificaron en el área donde Tsai había descrito el núcleo tegmental ventral, unos núcleos pigmentados que denominaron núcleo paranigral y núcleo parabraquial

pigmentoso. En el año 1979, Phillipson estudió la citoarquitectura del VTA en la rata utilizando técnicas citoarquitectónicas convencionales como es la tinción de Nissl e histoquímica con fluorescencia (Phillipson, 1979a, b). Este autor describió la existencia de otro pequeño grupo celular dopaminérgico citoarquitectónicamente diferente del VTA, al que denominó núcleo interfascicular, e indicó que podían distinguirse tres regiones dentro del grupo A10: la región del VTA, que comprende los núcleos PBP y PN, la región del CLi y la del IF. Además, Phillipson enfatizó la distinción entre el VTA y el A10 afirmando que no deberían considerarse sinónimos puesto que algunos estudios ya señalaban la existencia de neuronas gabaérgicas en el VTA, y no sólo dopaminérgicas, y además, en su estudio del VTA y del IF de la rata con el método de Golgi había observado que tanto el CLi como el IF tenían una organización y tipología celular diferentes entre sí y claramente distintas a las de los dos componentes o subdivisiones del VTA, el PBP y el PN. Este autor enfatizó la necesidad de recurrir a tinciones específicas para identificar las neuronas dopaminérgicas para poder definir los límites y subdivisiones del VTA, dado que la apariencia de las neuronas de VTA en tinciones como Nissl es muy similar a la de las neuronas de la formación reticular (Phillipson, 1979a, b).

En 1982, Swanson describió el núcleo rostral linear en el cerebro de la rata y afirmó que se trataba de otro núcleo dopaminérgico, identificado como tal por presentar inmunorreactividad frente a la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Este autor defendió que debido a las diferentes características citoarquitectónicas de los núcleos dopaminérgicos de la línea media (IF, CLi y RLi) comparadas con el resto del VTA, y a pesar de que contengan neuronas dopaminérgicas, estos núcleos no deberían incluirse dentro del VTA. Posteriormente, otros autores defendieron la equivalencia entre el VTA y el grupo A10 apelando al contenido en dopamina de ambos y distinguieron cinco núcleos dentro del VTA de la rata, el gato, el mono y el hombre, que son el PN, PBP, y los núcleos de la línea media IF, CLi y RLi (Halliday y Tork, 1986; Oades y Halliday, 1987).

Halliday y Tork (1986) analizaron mediante tinciones de Nissl la citoarquitectura de la región del VTA (que denominaron tegmento mesencefálico ventromedial) y de sus subdivisiones en la rata, el gato, el mono y el hombre y aportaron una detallada descripción relativa al volumen total de esta región y el volumen de cada una de sus subdivisiones. Asimismo, este estudio aportó información sobre el número total de

neuronas en el tegmento mesencefálico ventromedial y en sus subdivisiones. De acuerdo a los datos aportados por estos autores, esta región mesencefálica ocupa un volumen de 1,2 mm<sup>3</sup> en la rata y 183 mm<sup>3</sup> en el hombre, y contiene 27.000 neuronas en la rata, y 690.000 en el hombre. En todas las especies estudiadas por estos autores la subdivisión PBP es la de mayor tamaño representando aproximadamente el 51% del volumen total del tegmento ventromedial mesencefálico y contiene el 51% del número total de neuronas de esta región mesencefálica, mientras que PN, al igual que el núcleo central linear, representan un 19% del volumen y albergan un 14% del total de neuronas. Otras subdivisiones como el IF y el RLi representan el 9% y el 7% del volumen total y contienen el 9% y el 7% de las neuronas totales, respectivamente. Este mismo estudio aporta datos sobre la sustancia negra compacta (SNC) tales como que esta región tiene un volumen de 0,3 mm<sup>3</sup> y contiene 12.000 neuronas en la rata y en el hombre ocupa 68 mm<sup>3</sup> y alberga 436.000 neuronas.

Unos años después, el estudio llevado a cabo por McRitchie y colaboradores en 1996 sobre las características citoarquitectónicas del tegmento mesencefálico utilizando las tinciones inmunohistoquímicas para la enzima TH y la sustancia P en el cerebro de la rata y del hombre, concluyó que el grupo A10 comprendía siete componentes: VTA, PBP, PN, IF, CLi, RLi y el núcleo parapeduncular (Pap) (McRitchie y cols., 1996). Según estos autores, el VTA es una región compuesta por neuronas TH positivas (TH+) orientadas mediolateralmente situadas mediales a PBP y ventrales a las fibras del nervio oculomotor, en la porción ventromedial del núcleo rojo. Estos mismos autores definieron por primera vez el Pap en la rata y en el hombre como un núcleo situado entre el *tier* dorsal de la sustancia negra y el RLi, rostral a las fibras del nervio oculomotor. Este núcleo Pap había sido incluido en estudios previos dentro de la región rostral de VTA o del PBP (Grofova y cols., 1982; Loughlin y Fallon, 1984; Halliday y Tork, 1986; Jimenez-Castellanos y Graybiel, 1987; Domesick, 1988; German y cols., 1992). En su estudio, McRitchie y colaboradores (1996), afirmaron que el Pap estaba claramente diferenciado del PBP y de la región que ellos denominaron VTA por sus diferentes características citoarquitectónicas, tales como su menor densidad celular, el menor tamaño de sus células, la pequeña proporción de neuronas dopaminérgicas y su elevado número de neuronas que contienen proteínas ligadoras de calcio como la calbindina.



Las proyecciones dopaminérgicas al septo lateral (LS) desde el grupo A10 descritas por Swanson (1982) fueron atribuidas a este núcleo Pap (McRitchie y cols., 1996). Además, estos autores consideraron que el Pap es el origen de las proyecciones no dopaminérgicas a la formación hipocampal, proyecciones descritas previamente por Swanson (1982). Otro de los aspectos novedosos del estudio de McRitchie y colaboradores (1996) fue su propuesta de que el VTA era una región distinta a los núcleos PBP y PN, tanto en la rata como en el hombre. Estos autores defendieron que los estudios previos sobre la parcelación del VTA en estas dos especies habían incluido dentro de la subdivisión de PBP el territorio que ellos denominaban VTA propiamente dicho. Según McRitchie y colaboradores (1996), PN se distingue del VTA, la cual se sitúa dorsal a PN, por el tamaño de las células y su orientación y también por sus diferentes proyecciones, ya que la región de PN inerva la corteza cingular (Cg) y estructuras subcorticales (Nauta y cols., 1978; Swanson, 1982; Fallon y cols., 1983; Loughlin and Fallon, 1984; Seroogy y cols., 1987), incluyendo el septo lateral (Swanson, 1982), mientras que VTA proyecta a regiones corticales prefrontales y temporales. También hay diferencias en las proyecciones al estriado ya que PN proyecta principalmente a su región rostromedial mientras que VTA proyecta a la región estriatal caudolateral (Veening y cols., 1980). Además en VTA se observa una mayor proporción de neuronas TH+ que en PBP. Sin embargo, estas ideas propuestas por McRithie y colaboradores (1996) no fueron aceptadas por muchos autores posteriores. Franklin y Paxinos (2007) identificaron el homólogo del núcleo Pap en la rata y lo llamaron núcleo parainterfascicular, y propusieron utilizar este mismo término también en humanos y ratones. Concretamente en su atlas de coordenadas estereotáficas del ratón el PIF de extiende desde el nivel 0,24 mm lateral a la línea media hasta 0,48 mm, y se sitúa ventral a PBP y dorsal a PN, en la zona que en ediciones anteriores de este atlas habían denominado VTA. En la parcelación propuesta en el atlas de Franklin y Paxinos (2007), en el que VTA comprende las subdivisiones PBP, PN, PIF y rVTA, se han basado trabajos recientes del VTA de ratón como el de Fu y cols. (2012).

Una de las subdivisiones del VTA definida más tardíamente es la denominada cola caudal del VTA. Muchos términos diferentes han sido empleados para denominar a esta región mesencefálica: cola posterior del VTA (Perroti y cols., 2005), “área 2 de

células gabaérgicas dentro del VTA” (Olson y Nestler, 2007), la cola tegmental ventral (Ikemoto, 2007), “núcleo intersticial de la decusación del pedúnculo cerebeloso superior” (Paxinos y Watson, 2007), “tegmento pontino rostromedial” (Geisler y cols., 2008), polo caudal de VTA (Ferreira y cols., 2008), núcleo tegmental rostromedial (RMTg) (Jhou y cols., 2009a, b; Kaufling y cols., 2009) o cola del VTA (Barrot y cols., 2012; Bourdy y Barrot, 2012). Esta subdivisión fue delimitada por primera vez en 2005 por Perrotti y colaboradores en la rata y la definió como la región posterior del VTA situada entre los niveles de -6,04 y -7,3 mm caudales a bregma. Sin embargo, en el atlas de Paxinos y Watson (1998) el VTA se extendía solamente hasta -6,80 mm caudal a bregma. Perrotti y colaboradores (2005) mediante las tinciones inmunohistoquímicas para descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), que es un marcador de neuronas gabaérgicas, y para TH demostraron que la administración de psicoestimulantes inducía la expresión de  $\Delta$ FosB [variante del gen FosB que es inducido por la exposición crónica a drogas de abuso en regiones cerebrales como el núcleo accumbens (Acb), estriado dorsal, amígdala (A), corteza prefrontal (CPF)] sólo en las neuronas gabaérgicas de la región que denominó la cola posterior del VTA. No se sabe por qué la inducción de  $\Delta$ FosB se produce selectivamente en las neuronas gabaérgicas de esta región, pero Perrotti y colaboradores (2005) pensaron que podía deberse a que estas neuronas tuvieran distintas proyecciones aferentes a las de otras neuronas gabaérgicas situadas en otras regiones del VTA. La tinción frente a FosB mostró que este grupo de células gabaérgicas se extendía caudalmente más allá de los límites del VTA (Perrotti y cols., 2005).

Posteriormente, Ikemoto (2007) profundizó en la definición de la cola del VTA y utilizó la abreviatura VTT (abreviatura tomada de su nombre inglés: *ventral tegmental tail*). Afirmó que VTT era una región con una baja densidad de somas neuronales TH+ (**Figura 1**), localizada posteriormente al PN y lateral a la mitad posterior del IP posterior. Según Ikemoto (2007) la delimitación del VTT es relativamente sencilla ya que se distingue claramente del PN y del PBP con tinciones para la TH. Las características citoarquitectónicas de VTT con tinción de Nissl son similares a las de regiones más anteriores del VTA, por lo que autores como Ikemoto (2007) consideran esta región como una subdivisión del VTA.

Estudios posteriores señalaron que la zona denominada cola posterior del VTA era la región más rostral de otra estructura más amplia denominada núcleo tegmental rostromedial (RMTg) (Jhou y cols., 2009a, b; Kaufling y cols., 2009). Kaufling y colaboradores (2009) realizaron un estudio de las proyecciones aferentes de la cola del VTA en ratas, concluyendo que esta región recibía proyecciones similares al resto del VTA, por lo que se debía considerar una subregión de ésta, aunque la mayoría de sus células fueran gabaérgicas y albergase un bajo porcentaje de neuronas dopaminérgicas. Según estos autores la cola del VTA se extendía desde los niveles -6,04 mm a -7,04 mm caudales a bregma.

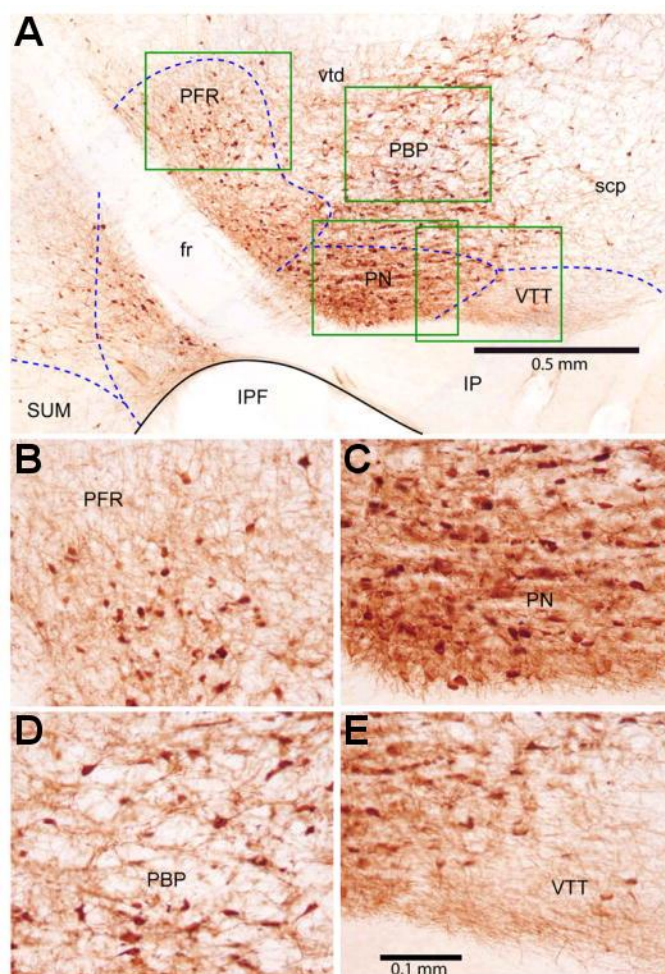
En 2012, Bourdy y Barrot señalaron que la cola del VTA y el núcleo tegmental rostromedial (cola VTA/RMTg) se referían a la misma estructura, la cual actuaba como un “freno” gabaérgico sobre los sistemas dopaminérgicos con origen en el VTA (Bourdy y Barrot, 2012). Según estos autores esta estructura se caracteriza especialmente por sus aferencias desde la habénula lateral (LHb) y sus importantes proyecciones eferentes a las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, al núcleo dorsal del rafe y al núcleo pedunculopontino (Jhou y cols., 2009a, b; Kaufling y cols., 2009, 2010a, Gonçalves y cols., 2012). Esta región denominada cola VTA/RMTg también expresa unos marcadores que la distinguen del resto de los núcleos colindantes entre los que se encuentran altos niveles de GAD 67 (descarboxilasa del ácido glutámico; enzima que participa en la síntesis de GABA) (Perroti y cols., 2005; Olson y Nestler, 2007; Jhou y cols., 2009a; Kaufling y cols., 2009, 2010a), elevada inmunorreactividad frente al receptor  $\mu$ -opioide (Jhou y cols., 2009a, 2012), notable expresión del gen  $\Delta$ FosB inducida tras la administración de psicoestimulantes (Perroti y cols., 2005; Geisler y cols., 2008; Jhou y cols., 2009a; Kaufling y cols., 2009, 2010b), y altos niveles del neuropéptido nociceptina (Jhou y cols., 2012). De acuerdo con Barrot y colaboradores (2012) en la región llamada cola de VTA/RMTg de las ratas se distingue dos partes: una que ocupa el tercio rostral de su territorio y otra caudal que comprende los dos tercios restantes. La parte rostral colinda con una subregión del PN y se sitúa dorsolateral al IP, mientras que la porción caudal se ubica lateralmente al núcleo mediano del rafe (MnR), está embebida dentro de la decusación del pedúnculo cerebeloso superior (scp) y se extiende hasta el borde rostral del núcleo pedunculopontino. La zona rostral presenta fuertes relaciones

anatómicas y funcionales con los sistemas dopaminérgicos, por lo que se denomina cola del VTA, y sin embargo la porción caudal comparte homología con las estructuras tegmentales, y para ser consistente con la nomenclatura de otras estructuras mesopontinas y otros núcleos tegmentales, se ha denominado núcleo tegmental rostromedial (RMTg) (Barrot y cols., 2012).

La región rostral de VTA fue definida como una subdivisión de VTA por primera vez en la rata en el atlas de Paxinos y Watson del año 2005, donde esta región aparece entre los niveles -4,5 mm y -5,20 mm caudales a bregma. En el ratón los límites de rVTA mejor definidos se encuentran en el atlas de Franklin y Paxinos de 2007. Según este atlas, rVTA se extiende desde el nivel 0,36 al 0,6 mm laterales a la línea media en el plano coronal, y en el plano sagital se sitúa rostral al fascículo retrorreflejo (fr), PBP, PIF, PN y SNC, desde los niveles -2,9 a -3,5 mm posteriores a bregma. Los estudios más recientes dedicados a detallar la parcelación nuclear del VTA en roedores son los de Ikemoto (2007) en la rata y el de Fu y colaboradores (2012) en el ratón. Además, a la hora de acometer esta tarea son imprescindibles los atlas de coordenadas estereotáxicas del cerebro de rata y de ratón (Paxinos y Watson, 2007; Franklin y Paxinos, 2007; 2012). El estudio de Ikemoto no considera A10 sinónimo del VTA y distingue cuatro zonas dentro del VTA, el PBP y el PN, que son las dos subdivisiones más ampliamente aceptadas del VTA, el área parafascicular retrorrefleja (PFR) y la cola tegmental ventral (Ikemoto, 2007). Atendiendo al contenido de neuronas inmunohistoquímicamente positivas para la TH este autor diferenció dos zonas dentro del VTA, una zona localizada en los dos tercios mediales del VTA que contiene una alta densidad de somas neuronales dopaminérgicos (TH+) que incluye el PBP y el PN, y otra con pocos cuerpos celulares TH+ que engloba al PFR y a la VTT. El PFR se localiza en la región más anterior del VTA y consiste en un grupo de somas neuronales de tamaño mediano o pequeño, que se tiñen moderadamente para la TH y están en contigüidad con los somas neuronales también positivos para la TH situados en el área hipotalámica posterior (PH), incluyendo el núcleo supramamilar (**Figura 1 A, B**). El PFR englobaría el rVTA y la región rostral del PIF. La subdivisión VTT del VTA es la otra región con una baja densidad de somas neuronales TH+ (**Figura 1 E**).

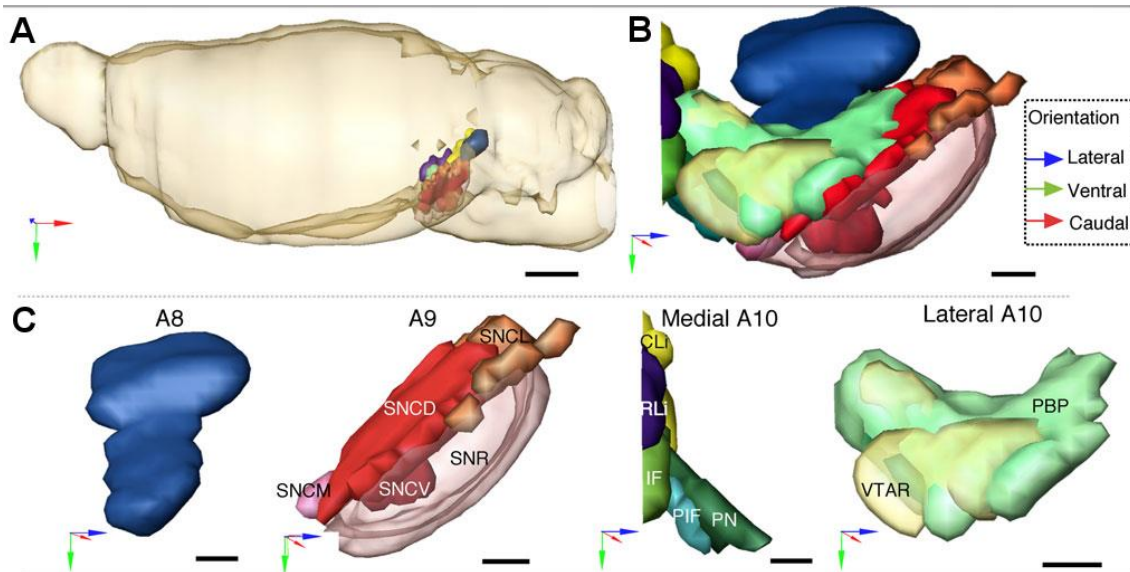
De acuerdo con Ikemoto (2007) el PN se sitúa adyacente a la porción anterolateral del núcleo IP y sus neuronas TH+ son relativamente homogéneas y de mediano tamaño, orientadas mediolateralmente (**Figura 1 C**). El PBP se caracteriza por su heterogeneidad citoarquitectónica, lo que contribuye a que sus límites sean difíciles de definir. Este núcleo incluye somas neuronales de tamaño grande y mediano sin una orientación espacial determinada (**Figura 1 B**). La zona más anterior de PBP contiene neuronas de gran tamaño TH+ que están en contigüidad con la región anterior de la SNC. En la región posterior del VTA, PBP ocupa el área dorsal y lateral al PN.

Ikemoto (2007) y otros autores entre los que se encuentran Swanson (1982), Halliday y Törk (1986), y Yamaguchi y colaboradores (2011) consideran que los tres núcleos dopaminérgicos situados en la línea media – los núcleos IF, CLi, y RLi- no forman parte del VTA porque, si bien contienen neuronas dopaminérgicas, son regiones que presentan características citoarquitectónicas diferentes del VTA. Sin embargo, otros autores como Del-Fava y colaboradores (2007) y Fu y colaboradores (2012) defienden que estos núcleos de la línea media deben ser considerados parte del VTA por la similitud de sus conexiones eferentes con las del resto de núcleos pertenecientes al VTA.



**Figura 1. Parcelación nuclear del VTA de la rata.** A: sección sagital teñida inmunohistoquímicamente para la tirosina hidroxilasa. Las áreas marcadas por un rectángulo en verde están aumentadas de tamaño en B, C, D, E. La barra de escala en E es válida para B-D. Imagen modificada de Ikemoto (2007). IPF: fosa interpeduncular; SUM: núcleo supramamilar; vtd: decusación tegmental ventral. Para el resto de abreviaturas véase la Lista de Abreviaturas.

Los atlas de coordenadas estereotáxicas de la rata de Paxinos y Watson (2007) y del ratón de Franklin y Paxinos (2007) distinguen cuatro regiones dentro del VTA, que son PBP, PN, VTAR y PIF. Según estos autores el PIF es el homólogo al parapeduncular en humanos (Huang y Paxinos, 1995) y se correspondería con la región del VTA que en ediciones anteriores del atlas (Paxinos y Watson, 1998) se referían como VTA. El estudio de Fu y colaboradores (2012) distingue siete subdivisiones dentro del VTA del ratón, que son PBP, PN, PIF, VTAR, IF, RL<sub>i</sub> y CL<sub>i</sub> (**Figura 2 y Figura 3**). La abreviatura VTAR usada por Fu y cols. (2012) y por Franklin y Paxinos (2007) corresponde con la abreviatura rVTA usada en este trabajo de Tesis Doctoral.



**Figura 2. Parcelación del VTA de ratón en base al contenido en neuronas tirosina hidroxilasa positivas y Nissl.** **A:** Vista lateral del cerebro de ratón con una reconstrucción en 3D de los grupos dopaminérgicos A8, A9 y A10. La barra de calibración representa 1 mm. **B, C:** Vista a mayor aumento de A8, A9 y A10 en el plano coronal. La barra de calibración de B y C representa 200  $\mu$ m. Imagen tomada de Fu y cols. (2012). SNCD: tier dorsal de la sustancia negra compacta; SNCL: tier lateral de la sustancia negra compacta; SNCM: tier medial de la sustancia negra compacta; SNCV: tier ventral de la sustancia negra compacta; SNR: sustancia negra reticular; VTAR: región rostral del área tegmental ventral. Para el resto de abreviaturas véase la Lista de Abreviaturas.

**Tabla 1.** Parcelación nuclear del VTA realizada en estudios previos y su relación con la definición del grupo A10

AÑO	AUTOR/ES	ESPECIE/ES	SUBDIVISIONES DEL VTA	RELACIÓN CON A10
1925	Tsai	Oposum	-	-
1940	Bodian	Perro	-	-
1954	Olszewski y Baxter	Hombre	PBP, PN	-
1961	Taber	Gato	PBP, PN	-
1964	Dahlström y Fuxe	Rata		A10 = PBP + Nu Central Linear + Nu intersticial + EW + Nu oculomotor
1978	Nauta y cols.	Rata	-	-
1978	Fallon y Moore	Rata	PBP, PN, Nu. Teg ventral de Tsai, nucleus linearis	-
1979	Phillipson	Rata	PBP, PN	A10 = VTA + IF + CLi
1982	Swanson	Rata	-	A10 = VTA + IF + Nu Central Linear + Nu intersticial de vtx + EW + Nu oculomotor + RLi + Nu. supramamilar
1983	Albanesse y Minciacchi	Rata	PBP, PN, IF	-
1986	Halliday y Törk	Rata, gato, mono, hombre	PBP, PN, IF, CLi, RLi	A10 = VTA
1987	Oades y Halliday	Rata, gato, mono, hombre	PBP, PN, IF, CLi, RLi	A10 = VTA
1996	McRitchie y cols.	Rata, hombre	-	A10 = VTA + PBP + PN + IF + CLi + RLi + Pap
1998	Paxinos y Watson	Rata	PN, PBP, VTA	
2005	Perroti	Rata	Define la cola posterior del VTA	-
2007	Ikemoto	Rata	PBP, PN, PFR, VTT	-
2007	Del Fava y cols.	Rata	PBP, PN, IF, CLi, RLi	-
2007	Paxinos y Watson	Rata	PBP, PN, PIF <sup>1</sup> , VTAR	-
2007	Franklin y Paxinos	Ratón	PBP, PN, PIF, VTAR	-
2008	Ferreira y cols.	Rata	PBP, PN, IF, CLi, RLi, VTAc <sup>2</sup>	-
2009	Jhou y cols.	Rata	Nu. tegmental rostromedial (RMTg) <sup>3</sup>	-
2012	Fu y cols.	Ratón	PBP, PN, PIF, VTAR, IF, RLi, CLi	A10 = VTA

-: No subdivisiones o no equiparación con el grupo A10; 1. PIF: homólogo al Pap en humanos. 2. VTAc: polo caudal del VTA (equivale al VTT de Ikemoto, 2007). 3. la región rostral del RMTg equivale a VTT. ATvc: polo caudal del VTA; VTAR: región rostral del VTA; CLi: núcleo caudal linear; IF: núcleo interfascicular; IP: núcleo interpeduncular; Nu: núcleo; Pap: núcleo parapeduncular; PBP: núcleo parabraquial pigmentado; PFR: área parafascicular retrorrefleja; PIF: núcleo parainterfascicular; PN: núcleo paranigral; RLi: núcleo rostral linear; RMTg: núcleo tegmental rostromedial; VTT (del inglés *ventral tegmental tail*): cola del VTA.



## **1.2 POBLACIONES NEURONALES DEL VTA**

### **1.2.1 Arquitectura celular del VTA**

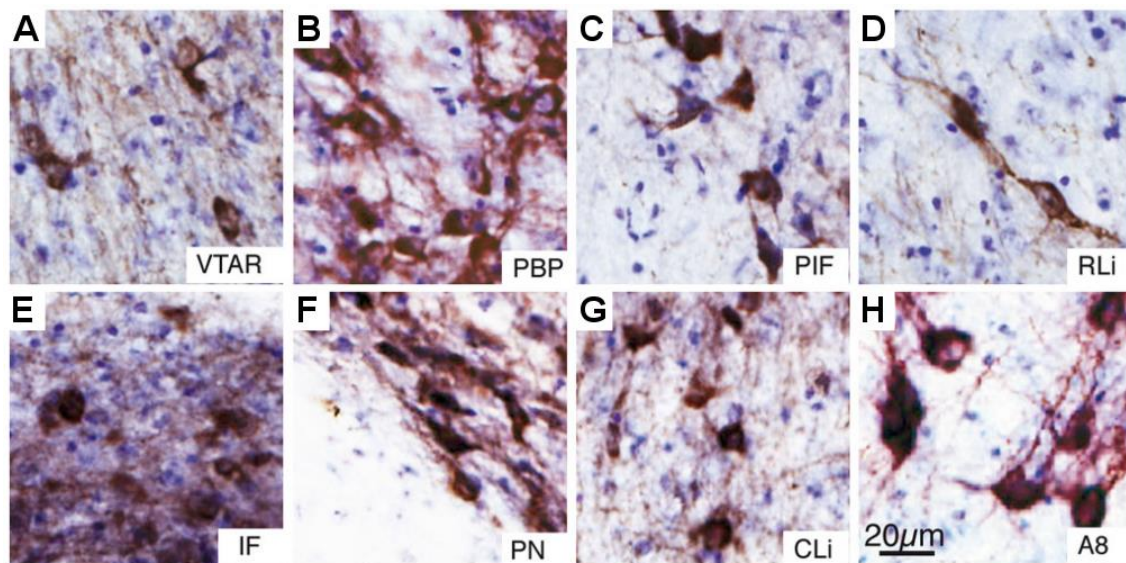
El primer estudio citoarquitectónico detallado del VTA fue el de Phillipson (1979a, b), cuyos trabajos en la rata con las técnicas de Nissl y Golgi aportaron una valiosa información sobre la citoarquitectura de las subdivisiones clásicas del VTA (PBP y PN), además de las de los núcleos caudal linear e interfascicular. Este autor señaló que con tinción de Nissl las neuronas de PN se caracterizaban por tener cuerpos de tamaño pequeño o mediano, que según estudios posteriores tienen un diámetro mayor de unos 13  $\mu\text{m}$  aproximadamente (Halliday y Törk, 1986), y con forma redondeada, estrellada o en huso. En el plano frontal sus campos dendríticos se organizan en el plano horizontal y en secciones sagitales en dirección antero-medial. En cuanto a PBP, Phillipson (1979a, b) afirmó que las neuronas eran en su mayoría de tamaño mediano, excepto algunas que eran más pequeñas, y según estudios posteriores sus dimensiones aproximadas son de unos 14  $\mu\text{m}$  en el diámetro mayor de sus somas (Halliday y Törk, 1986), y sus árboles dendríticos no mostraban una preferencia en su orientación. Las dendritas del VTA nunca muestran una disposición vertical a diferencia de las dendritas de las neuronas de la SNC que se disponen en el plano vertical y horizontal (Phillipson, 1979b). Con la tinción de Golgi, Phillipson (1979b) distinguió dos tipos morfológicos distintos de neuronas en VTA. Las neuronas de tipo 1 eran de tamaño pequeño o mediano, con forma estrellada o fusiforme, y con 2 a 4 dendritas primarias que se dividían en varicosas dendritas secundarias. Rara vez se observaban espinas en el soma o las dendritas de las neuronas tipo 1 y sus axones solían surgir de las dendritas primarias. Las divisiones axonales locales de estas neuronas se ramificaban cerca de neuronas vecinas y sus engrosamientos contactaban con dendritas primarias de neuronas colindantes. Las neuronas de tipo 2 eran de tamaño mediano, la mayoría fusiformes aunque también había alguna estrellada, el axón emergía sobre todo de dendritas primarias, las cuales oscilaban entre 2 y 5. Las dendritas tenían pocas varicosidades y eran más frecuentes las espinas tanto en el soma como en las dendritas. Las neuronas de tipo 1 predominaban en la región medial del VTA mientras que las de tipo 2 eran más numerosas en la región lateral, concretamente en la región ventrolateral de PN.

También se identificó un amplio espectro de tipos intermedios de neuronas entre las de tipo 1 y las de tipo 2. En el CLi, las neuronas eran de menor tamaño que las de PBP y PN, de forma redondeada y frecuentemente con forma de huso, y con sus dendritas orientadas en un plano dorsoventral. Tenían de 2 a 5 dendritas primarias. Sus dendritas secundarias eran marcadamente varicosas y algunas presentaban dendritas extremadamente largas que se extendían en dirección ventral cientos de micras. No se observaron neuronas de tipo 2 espinosas a diferencia de PBP y PN. Las neuronas del IF fueron las más pequeñas, sus somas eran redondeados, espinosos o estrellados y de ellos surgían de 2 a 6 dendritas primarias. La mayoría eran dendritas largas ( $> 100 \mu\text{m}$ ) y marcadamente varicosas pero algunas eran cortas ( $< 50 \mu\text{m}$ ) y gruesas, sobre todo en la parte anterior del núcleo. Tampoco se observaron neuronas de tipo 2 espinosas, a diferencia de PBP y PN.

En 1986, Halliday y Törk abordaron un estudio minucioso de las características citoarquitectónicas del tegmento ventromedial mesencefálico (región correspondiente al grupo A10) en la rata, el gato, el mono y el hombre. Este trabajo aportó información de las subdivisiones PBP, PN, núcleo linear central, núcleo linear rostral y núcleo interfascicular relativa a su volumen, número y densidad de neuronas y tamaño de las mismas. Según este estudio y otros precedentes (Swanson, 1982; Poirier y cols., 1983; Domesick y cols., 1983), esta región mesencefálica medial de la rata engloba unas 14.000 células cuyos diámetros oscilan entre los 7,5 y 35  $\mu\text{m}$ , siendo la media de unos 13-14  $\mu\text{m}$  en los núcleos PBP y PN.

Ya en 1979, Phillipson señaló que las diferentes subdivisiones citoarquitectónicas de VTA, realizadas teniendo en cuenta el tamaño y la forma del soma, la orientación del dominio somatodendrítico, así como la densidad celular, se correspondían con una diferente conectividad para cada subdivisión (Phillipson, 1979a). Estudios previos a éste (Lindvall y cols., 1978; Fallon y Moore, 1978) y otros posteriores (Swanson, 1982; Halliday y Törk, 1984; Scheibner y Törk, 1987) también han defendido que existe una distribución topográfica de las conexiones eferentes de los grupos A10 y A9. Las diferencias en la citoarquitectura y en las proyecciones de las distintas subdivisiones del VTA sugieren que puedan tener funciones diversas (Halliday y Törk, 1986) como se explica en el apartado 1.3.

El estudio de Fu y colaboradores (2012) sobre la citoarquitectura y quimioarquitectura de los grupos celulares dopaminérgicos, A8, A9 y A10 del ratón ha sido el más detallado de los realizados hasta el momento en esa especie. Tal y como se comentó en el apartado 1.1.2, estos autores consideran siete subdivisiones dentro del VTA (IF, CLi, RLi, PN, PIF, PBP y rVTA) y diferencian los tipos celulares presentes en estas regiones por el diámetro mayor de sus somas visualizados mediante inmunohistoquímica frente a TH con una contratinción con Nissl (**Figura 3**). Según estos autores, el diámetro mayor medio de las neuronas dopaminérgicas del VTA es de unas 17  $\mu\text{m}$ , localizándose las de menor diámetro en el IF (12  $\mu\text{m}$ ), otras de tamaño entre 15-16  $\mu\text{m}$  diseminadas entre PN, CLi, RLi, PIF, en el rVTA las neuronas eran ligeramente mayores (17  $\mu\text{m}$ ), y en el PBP éstas alcanzaban el mayor diámetro, siendo éste de 18  $\mu\text{m}$ , similar al diámetro medio de las neuronas dopaminérgicas de la SNC. Las neuronas con mayor diámetro medio (20  $\mu\text{m}$ ) se encontraron en el grupo A8 del campo retrorrubral (Fu y cols., 2012).



**Figura 3. Morfología de células dopaminérgicas de los grupos A8 y A10.** A-H: Microfotografías a gran aumento que muestran la morfología de las células inmunorreactivas frente a la TH (marrón oscuro) con contratinción con Nissl (señal azul) en las varias subdivisiones del VTA (A-G) y en el grupo A8 (H). La barra de calibración de H representa 20 $\mu\text{m}$  y es válida para A-G. Imagen modificada de Fu y cols. (2012). VTAR: región rostral del área tegmental ventral. Para el resto de abreviaturas véase la Lista de Abreviaturas

### **1.2.2 Poblaciones neuronales caracterizadas neuroquímicamente**

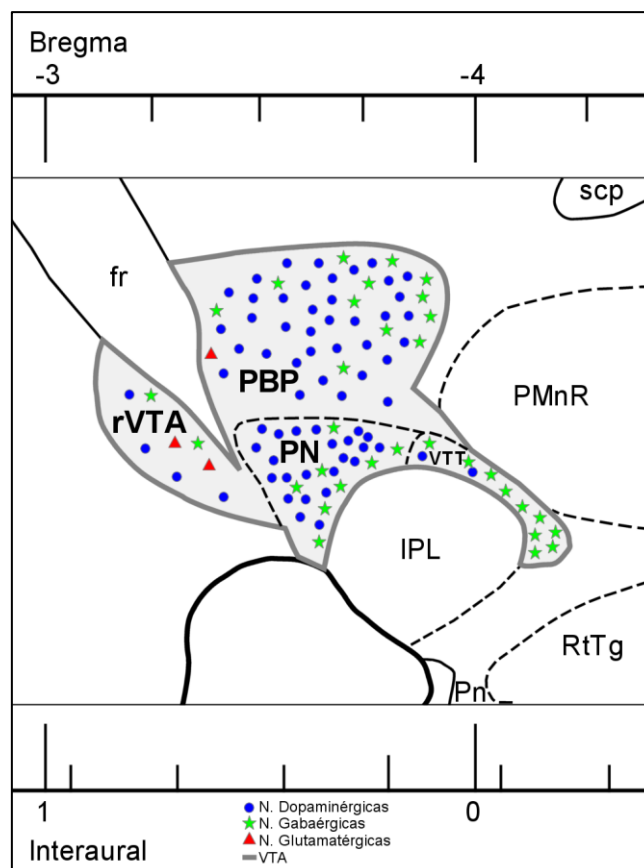
Hasta 1982 se consideró que las neuronas del VTA estaban representadas fundamentalmente por las neuronas dopaminérgicas del grupo A10 (Dahlström y Fuxe, 1964; Fallon y Moore, 1978; Moore y Bloom, 1978). Sin embargo, la mayor riqueza neuroquímica que alberga el VTA se comenzó a conocer a partir de esa fecha gracias a diversos estudios que identificaron una importante población de neuronas gabaérgicas ubicadas en este territorio medial y ventral del mesencéfalo (Nagai y cols., 1983; Olson y Nestler, 2007). Para identificar estas neuronas gabaérgicas, Nagai y colaboradores (1983) emplearon técnicas histoquímicas para evidenciar la presencia de una enzima implicada en el catabolismo de GABA, la 4-amino-butanóico: 2 oxoglutarato transaminasa (GABA-T), la cual se localiza a nivel presináptico en las neuronas gabaérgicas (Nagai y cols., 1983). Los estudios posteriores (Olson y Nestler, 2007) emplearon técnicas de inmunohistoquímica para identificar la enzima fundamental en la síntesis de GABA, que es la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). Otros autores, reconocieron también otra población celular de neuronas glutamatérgicas, menos numerosa que la de dopaminérgicas y la de gabaérgicas, (Hur y Zaborszky, 2005; Kawano y cols., 2006; Nair-Roberts y cols., 2008; Morales y Root, 2014; Bariselli y cols., 2016).

Actualmente se considera que dentro del VTA de los roedores coexisten neuronas dopaminérgicas, las cuales constituyen aproximadamente el 65% de las neuronas del VTA, neuronas gabaérgicas, que representan el 33%, y una pequeña población de neuronas glutamatérgicas (2-3%) (Kawano y cols., 2006; Nair-Roberts y cols., 2008; Morales y Root, 2014; Bariselli y cols., 2016). Estos datos proceden de estudios de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* que identifican a las neuronas dopaminérgicas por su expresión de la TH, a las gabaérgicas por expresar el mRNA de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico, y a las neuronas glutamatérgicas por expresar el transportador vesicular de glutamato tipo 2 (vGluT2), necesario para la recaptación y almacenamiento del glutamato (Bariselli y cols., 2016). En VTA existen neuronas que coexpresan tanto TH como proteínas involucradas en el metabolismo de GABA o glutamato (Kawano y cols., 2006; Olson y Nestler, 2007), lo que indica que estas neuronas pueden liberar dopamina (DA) y aminoácidos transmisores. Se ha demostrado que las neuronas de VTA ubicadas en su sector más medial coexpresan vGluT2 y TH

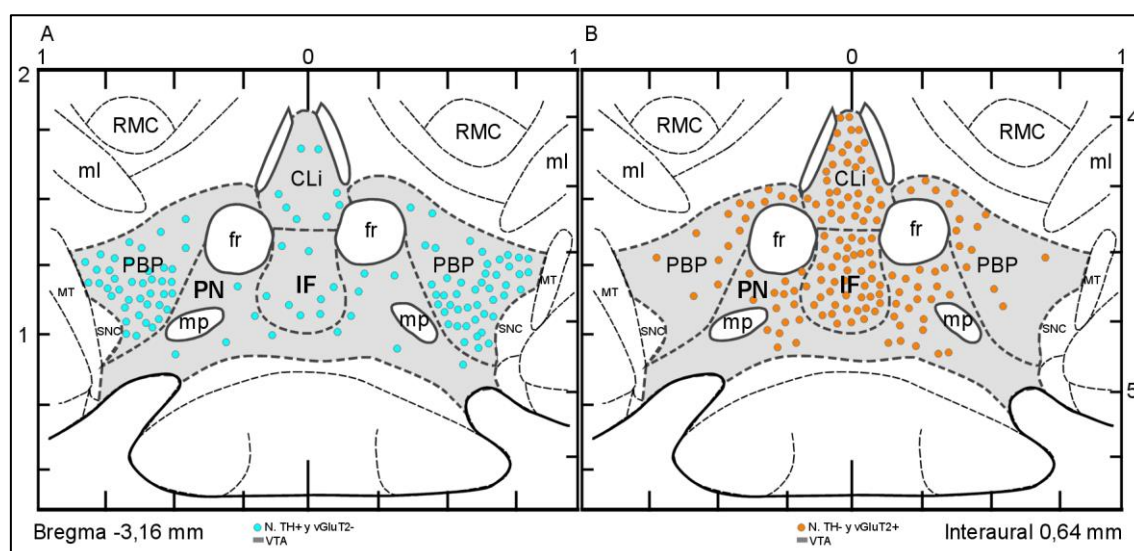
(Stuber y cols., 2010; Yamaguchi y cols., 2011) y, además las varicosidades de la corteza prefrontal y del núcleo accumbens también coexpresan ambas proteínas (Yamaguchi y cols., 2011; Gorelova y cols., 2012). Otro estudio indica que los axones dopaminérgicos que liberan GABA utilizan el transportador vesicular de monoaminas (VMAT2) en vez del conocido transportador vesicular de GABA (VGAT) (Tritsch y cols., 2012). Los estudios realizados en roedores sobre la distribución de estas diferentes poblaciones de neuronas neuroquímicamente definidas dentro del VTA (**Figura 4**), indican que las neuronas dopaminérgicas del VTA (TH+) se distribuyen homogéneamente por todas sus subdivisiones, mientras que las neuronas glutamatérgicas, incluyendo en este grupo las neuronas que sólo expresan el vGluT2 y las que coexpresan el vGluT2 y la TH, tienen una distribución topográfica más selectiva, concentrándose en una región rostromedial del VTA que incluye el RLi, la región medial del PBP y el rVTA (Kawano y cols., 2006; Yamaguchi y cols., 2011; Morales y Root, 2014; Bariselli y cols., 2016). Según el estudio de Yamaguchi y colaboradores (2015) realizado en ratones, las neuronas TH+ y vGluT2- están presentes en todas las subdivisiones del VTA, a lo largo de toda su extensión rostrocaudal, pero aparecen con mayor densidad en las regiones laterales del VTA sin embargo, las neuronas TH- y vGluT2+, presentan un gradiente creciente latero-medial, de tal forma que en regiones laterales del VTA son infrecuentes y se concentran sobre todo en la línea media, incluyendo el RLi y el IF (**Figura 5**). Las neuronas gabaérgicas (expresan GAD) se distribuyen más homogéneamente por todo el VTA, entremezclándose con las neuronas dopaminérgicas (Olson y Nestler, 2007; Bariselli y cols., 2016) Si bien, estas neuronas GAD-positivas son especialmente numerosas en la región dorsal del VTA, correspondiendo al sector dorsolateral del PBP, y en la región caudal del VTA, adyacente al IP que corresponde con VTT (Olson y Nestler, 2007). Las neuronas gabaérgicas juegan un importante papel tanto en la regulación de la actividad de neuronas dopaminérgicas del VTA a través de colaterales locales de sus axones, como en la regulación de la actividad de neuronas del estriado y de la corteza cerebral, a través de sus axones de proyección (Bayer y Pickel, 1991; Van Bosckstaele y Pickel, 1995; Carr y Sesack, 2000; Melis y cols., 2002; Korotkova y cols., 2004).

Estudios recientes indican que las diferentes poblaciones neuronales definidas neuroquímicamente del VTA inervan específicamente diversas regiones cerebrales y

además desempeñan distintas funciones relacionadas con aspectos del comportamiento como la recompensa y la aversión (Stamatakis y cols., 2013; Lammel y cols., 2014; Bariselli y cols., 2016).



**Figura 4. Distribución de las poblaciones de neuronas neuroquímicamente definidas del VTA.** Visión sagital del encéfalo de ratón a 0,36 mm lateral respecto de la línea media en la que se representa esquemáticamente la distribución de las neuronas dopaminérgicas, gabaérgicas y glutamatérgicas en las principales subdivisiones del VTA: PBP, PN, rVTA y VTT. Esta imagen resume los datos proporcionados por los siguientes estudios: Olson y Nestler (2007); Nair Roberts y cols. (2008); Morales y Root (2014); Bariselli y cols. (2016). Véase la Lista de Abreviaturas.



**Figura 5. Distribución de las neuronas de VTA que expresan tirosina hidroxilasa (TH) o mRNA del transportador vesicular de glutamato de tipo 2 (vGluT2).** A: Visión coronal del mesencéfalo de ratón, a -3,16 mm de bregma, que muestra la distribución de las neuronas que expresan TH (TH+) como marcador de producción de dopamina y que carecen de mRNA para vGluT2 (vGluT2-). Nótese que las neuronas TH+ y vGluT2-, se concentran en las regiones laterales del VTA. B: Visión coronal del mesencéfalo de ratón que muestra la distribución de las neuronas que expresan mRNA para vGluT2 (vGluT2+) pero carecen de TH (TH-). La distribución de estas neuronas TH- y vGluT2+ sigue un gradiente creciente latero-medial de tal forma que en regiones laterales del VTA son infrecuentes y se concentran sobre todo en la línea media, incluyendo el RLi y el IF. Imagen modificada de Yamaguchi y cols., 2015.

mp: pedúnculo mamilar; mt: núcleo terminal medial del tracto óptico accesorio; RMC: núcleo rojo, parte magnocelular. Para el resto de abreviaturas véase la Lista de Abreviaturas.

### 1.3 PROYECCIONES EFERENTES DEL VTA

Las proyecciones eferentes del VTA han sido objeto de estudio por distintos grupos de investigadores, sobre todo desde los años 70 del siglo XX (**Tabla 2**). Ya desde los primeros estudios realizados en la rata con la técnica de histofluorescencia de las monoaminas a finales de los años 60 y comienzo de los 70, se pudieron distinguir con claridad los sistemas nigroestriatal y mesolímbico con orígenes en los grupos A9 y A10, respectivamente (Andén y cols., 1966; Ungerstedt, 1971). Precisamente el término mesolímbico se acuñó en base a las observaciones de estos autores de que las neuronas del grupo A10 proyectaban masivamente al tubérculo olfatorio y al núcleo accumbens, que son los territorios del estriado que reciben proyecciones telencefálicas desde la formación del hipocampo y el complejo amigdalino. Otros estudios completaron el concepto del sistema mesolímbico demostrando que el grupo A10 también proyecta al núcleo central de la amígdala (Ce), al núcleo del lecho de la estría terminal (BST) y a las cortezas límbicas ubicadas dorsales y anteriores a la rodilla del cuerpo calloso y a la

corteza entorrinal (Fuxe y cols., 1974; Lindvall y cols., 1974; Beckstead y cols., 1979). El estudio detallado de las proyecciones eferentes del VTA y de la sustancia negra, llevado a cabo por Beckstead y colaboradores en 1979 mediante inyecciones de aminoácidos tritiados, aportó nuevas dianas del sistema mesolímbico inervadas por neuronas dopaminérgicas del VTA, tales como el área hipotalámica lateral, región preóptica, banda diagonal de Broca (DBB), septo lateral, núcleo dorsal del rafe y *locus coeruleus* (LC) y los sectores mediales del caudado-putamen (CPu). Esta inervación del estriado dorsal es menos intensa que la que reciben el tubérculo olfatorio y el núcleo accumbens.

El empleo de trazadores retrógrados propició que Fallon y Moore (1978) describieran por primera vez una topografía de las proyecciones de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral de la rata. Este estudio mostró tres patrones topográficos en los planos dorsoventral, mediolateral y anteroposterior, de forma que el origen de los axones que inervan estructuras límbicas del prosencéfalo basal tiene lugar en regiones dorsales del VTA y SNC, mientras que las neuronas ubicadas en la región ventral de la SNC y del VTA proyectaban a estructuras dorsales del prosencéfalo basal como el septo, el núcleo accumbens y porciones ventrales del estriado. En cuanto a la topografía mediolateral, estos autores afirmaron que los sectores mediales de la SNC y del VTA proyectaban a las regiones mediales del prosencéfalo basal y caudado-putamen mientras que las regiones laterales de la SNC y del VTA proyectaban a las regiones laterales del prosencéfalo basal y del caudado-putamen. En cuanto a la topografía anteroposterior, los sectores anteriores de la SNC y del VTA inervaban principalmente zonas anteriores del prosencéfalo basal y del caudado-putamen mientras que los sectores posteriores de la SNC y del VTA lo hacían en zonas más posteriores del prosencéfalo basal y caudado-putamen.

Paralelamente se describió otra topografía mediolateral de estas proyecciones según la cual neuronas situadas en regiones mediales de la SNC y del VTA inervan la corteza frontal y el septo, mientras que las ubicadas más lateralmente en estos núcleos lo hacen en el núcleo accumbens y en el tubérculo olfatorio (Lindvall y Björklund, 1978). Posteriormente, aparecieron otros trabajos centrados en analizar la topografía de las proyecciones mesocorticales (Lindvall y cols., 1978) mesolímbicas (Albanese y Minciacchi, 1983) y mesoestriatales (Gerfen y cols., 1987a, b). Lindvall y colaboradores



(1978) distinguieron tres sistemas dopaminérgicos de proyección desde el mesencéfalo a la corteza frontal en la rata: el sistema anteromedial formado por las proyecciones que se originan en la parte medial del A10 e inervan la región pregenual de la corteza anteromedial; el sistema suprarinal que se origina en la región dorsolateral del A10 y proyecta a la parte dorsal de la corteza perirrinal; y el sistema supragenual constituido por las proyecciones que surgen desde la región ventrolateral del A10 y de la SN para inervar la corteza anteromedial y supragenual. Albanese y Minciacchi (1983) en su estudio de las proyecciones eferentes del VTA en ratas, observó que la región medial de la SNC y la región adyacente del VTA donde se ubica PN, inervan zonas rostrales de la corteza frontal mientras que la región más medial del VTA inerva zonas más caudales de la corteza frontal. Albanese y Minciacchi (1983) también señalaron que la región más medial del VTA junto con el núcleo interfascicular inervan el septo lateral ipsilateral y contralateral, la región medial y dorsal del VTA inerva el núcleo accumbens ipsilateral principalmente y también algo el accumbens contralateral, sin embargo la región lateral del VTA inerva el caudado-putamen y la región dorsal del VTA proyecta a la habénula lateral ipsilateral. En cuanto al sistema mesoestriado, Gerfen y colaboradores (1987a, b) concluyeron en sus estudios realizados en ratas, que las neuronas dopaminérgicas mesoestriadas de la sustancia negra ubicadas en la región dorsal (parte dorsal de la SNC) proyectaban a la matriz del estriado (zona pobre en receptores  $\mu$ -opioides) mientras que las de la región ventral (parte ventral de la SNC y de la SNR) lo hacían a unos compartimentos parcheados (estriosomas o zona rica en receptores  $\mu$ -opioides). Las proyecciones dopaminérgicas del VTA inervan la matriz del estriado ventromedial y el núcleo accumbens, mientras que las proyecciones dopaminérgicas del RRF inervan la matriz del estriado pero en la región dorsal (Gerfen y cols., 1987a, b).

Una de las clasificaciones más aceptadas de los sistemas de proyección eferentes dopaminérgicos desde el mesencéfalo ventral es la propuesta por Oades y Halliday en 1987. Según estos autores en el VTA se pueden distinguir cinco sistemas eferentes dopaminérgicos que son: el sistema mesocortical, el mesolímbico, el mesoestriatal o nigroestriatal, el mesodiencefálico y el mesorrombencefálico. El sistema mesocortical se origina en el VTA e inerva fundamentalmente a las cortezas insular, prefrontal y orbitofrontal. También se incluyen en este sistema las proyecciones que desde el VTA

inervan cortezas asociativas sensitivas, motoras y límbicas. El sistema mesolímbico se origina en neuronas dopaminérgicas del VTA que invierten sobre todo al núcleo accumbens (Lindvall y cols., 1977; Nauta y cols., 1978; Fallon y Moore, 1978; Albanese y Minciacchi, 1983) y al tubérculo olfatorio (Lindvall y cols., 1977; Fallon y Moore, 1978; Swanson, 1982; Del Fava y cols., 2007), pero también, aunque con menor intensidad, a otras regiones límbicas corticales, al complejo septo-hipocámpal y a la amígdala (Fallon y Moore, 1978). El sistema mesoestriatal o nigroestriatal se origina en la SNC y en el VTA e inerva el estriado dorsal (Louglin y Fallon, 1982; Albanese y Minciacchi, 1983; Gerfen y cols., 1987a, b; Prensa y Parent, 2001). El sistema mesodiencefálico se origina también en la SNC y el VTA e inerva varios núcleos talámicos e hipotalámicos (Swanson, 1982; Albanese y Minciacchi, 1983; Del Fava y cols., 2007). El sistema mesorrombencefálico se origina en la SNC y el VTA e inerva núcleos monoaminérgicos, el colículo superior, la formación reticular y la sustancia gris periacueductal (Swanson, 1982).

El sistema dopaminérgico mesolímbico ha sido uno de los que ha suscitado mayor interés debido a su estrecha relación con el sistema de recompensa y, por tanto, a su implicación en los mecanismos fisiopatológicos de la adicción a las drogas de abuso (Berridge y Robinson, 1998; Wise, 2002, 2004, 2009; Salome y Correa, 2002; Ungless, 2004; Ikemoto, 2007; Corominas-Roso y cols., 2007; Arias-Carrión y cols., 2010; Pitchers y cols., 2014; Ranaldi, 2014). El estudio de Ikemoto (2007) con inyecciones del trazador retrógrado Fluorogold junto con tinciones inmunohistoquímicas frente a la TH en ratas distinguió dos sistemas de proyección con origen en VTA que alcanzaban el estriado ventral, formando parte del circuito dopaminérgico de la recompensa. Este autor mostró que las neuronas dopaminérgicas localizadas en el VTA posteromedial y en el núcleo central (o caudal) lineal proyectaban selectivamente al estriado ventromedial (incluyendo el tubérculo olfatorio medial y la parte medial de la región *shell* del núcleo accumbens), mientras que las neuronas de la región lateral del VTA proyectaban al estriado ventrolateral (región *core* del núcleo accumbens, parte lateral de la región *shell* del núcleo accumbens y parte lateral del tubérculo olfatorio). Según Ikemoto (2007), esta división del sistema de proyección dopaminérgico mesolímbico en dos vías segregadas explicaba el hecho de que drogas de abuso como la cocaína y las anfetaminas producían más recompensa cuando se administraban en el estriado ventromedial que

en el estriado ventrolateral (Ikemoto y cols., 2005), o que la nicotina (Ikemoto y cols., 2006), los opiáceos (Zangen y cols., 2002) o los cannabinoides (Zangen y cols., 2006) eran más gratificantes cuando se administraban en la región posterior del VTA o en el núcleo central (o caudal) linear que en regiones anteriores del VTA.

Hasta finales de los años 90 la mayoría de los estudios de la proyecciones del VTA se referían al conjunto de neuronas ubicadas en esta región o sólo a su población de neuronas dopaminérgicas, pero a partir de entonces aparecieron algunos estudios centrados en analizar las proyecciones eferentes de neuronas gabaérgicas del VTA, describiéndose proyecciones con este neurotransmisor inhibitorio al núcleo accumbens (Van Bockstaele y Pickel, 1995; Carr y Sesack, 2000) y a la corteza prefrontal medial (Carr y Sesack, 2000; Yetnikoff y cols., 2014). Del-Fava y colaboradores (2007) desarrollaron la idea de que el conocimiento de las conexiones específicas de las distintas regiones o subdivisiones del VTA puede contribuir a esclarecer cuál es su especialización funcional. Así, estos autores analizaron por primera vez, en ratas, las proyecciones del núcleo rostral linear. Este núcleo perteneciente al VTA es fundamentalmente gabaérgico e inerva intensamente el tubérculo olfatorio y la parte ventrolateral del pálido ventral (VP). El RLi también inerva de manera más moderada, al núcleo preóptico magnocelular, hipotálamo lateral, núcleo talámico mediodorsal (MD), habénula lateral y la región supraoculomotora, y muy ligeramente a la corteza prefrontal, amígdala basolateral (BL) y núcleo dorsal del rafe. Sin embargo, las proyecciones de este núcleo evitan claramente el núcleo accumbens. Atendiendo a las proyecciones eferentes del núcleo RLi y, sobre todo, a sus conexiones con el núcleo talámico mediodorsal y con el núcleo preóptico magnocelular, Del-Fava y colaboradores (2007) propusieron que este núcleo del VTA podría tener un papel importante en los comportamientos guiados por el olfato.

El estudio realizado por Lammel y colaboradores (2008) fue el primero en analizar en ratones las proyecciones dopaminérgicas desde algunas subdivisiones del VTA (concretamente desde el PBP, PN e IF) a la corteza cerebral y a estructuras límbicas subcorticales. Para ello, estos autores combinaron inyecciones de marcadores retrógrados con inmunohistoquímica para la TH, registro electrofisiológico y la cuantificación de mRNA de TH, VMAT2, DAT, receptores dopaminérgicos D2 y canales GIRK2. Los resultados de este estudio demostraron que las proyecciones

dopaminérgicas desde el VTA a la corteza prefrontal medial, a la amígdala basolateral, a la región *core* del núcleo accumbens y a la parte medial de la región *shell* del accumbens surgen de neuronas que se concentran principalmente en la parte medial de PN y en la zona medioventral de PBP, aunque también se observan algunas neuronas en el IF. Sin embargo, las proyecciones a la región lateral del *shell* del núcleo accumbens surgen fundamentalmente de PBP. Un estudio muy reciente de la vía mesoaccumbal mediante trazadores retrógrados combinados con inmunohistoquímica frente a la TH ha puesto de manifiesto que pequeños territorios de los compartimentos *core* y *shell* del núcleo accumbens están inervados simultáneamente por neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas de muchas subdivisiones del VTA (Rodríguez-López y cols., 2017). Estos autores demostraron que las subdivisiones más mediales del VTA, como el núcleo caudal linear, proyectan a territorios mediales del *core*, mientras que territorios más laterales del núcleo accumbens son la diana de neuronas ubicadas en PBP y PN (Rodríguez-López y cols., 2017).

Lammel y colaboradores (2008) identificaron un tipo concreto de neuronas dopaminérgicas mesoprefrontales pertenecientes al sistema dopaminérgico mesocorticolímbico que se caracterizan por sus propiedades electrofisiológicas (son de tipo *fast-firing*, a diferencia de las neuronas convencionales del VTA que se caracterizan por ser *low-firing*), moleculares (pequeña expresión de DAT y TH), y por sus proyecciones, ya que inervan la corteza prefrontal, la región *core* del accumbens, la parte medial de la región *shell* del accumbens y la amígdala basolateral. Sin embargo las neuronas conocidas hasta entonces del VTA proyectaban a la región *shell* del accumbens y al estriado dorsolateral. Además estas neuronas mesoprefrontales no poseen a nivel somatodendrítico canales GIRK2 funcionales asociados a los autorreceptores D2 (Lammel y cols., 2008). En un estudio realizado en ratas, Hosp y colaboradores (2011) demostraron que las proyecciones dopaminérgicas a la corteza motora primaria (M1) procedían del VTA ipsilateral y que eran necesarias para adquirir una nueva habilidad motora a través del entrenamiento por repetición (Hosp y cols., 2011).

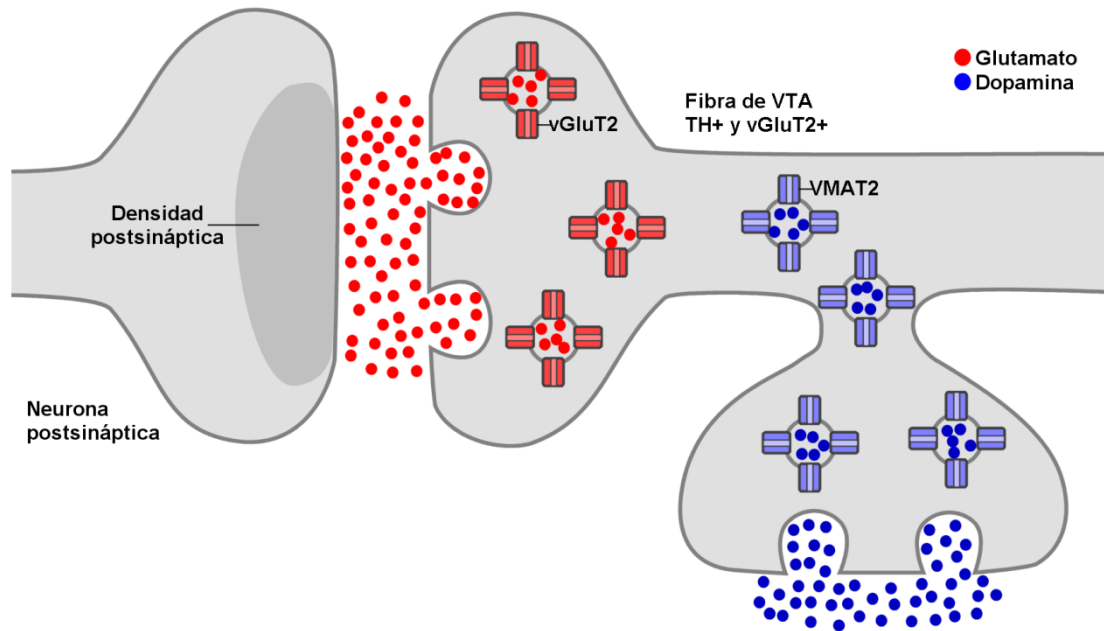
Uno de los estudios recientes más detallados sobre las proyecciones gabaérgicas y glutamatérgicas del VTA realizado en ratones es el de Taylor y colaboradores (2014). Estos autores emplearon un vector viral como trazador anterógrado, trazadores

retrógrados clásicos y técnicas de inmunohistoquímica y demostraron que las neuronas gabaérgicas del VTA envían numerosas proyecciones al pálido ventral, los núcleos preópticos lateral (LPO) y magnocelular, el hipotálamo lateral y la habénula lateral (habiéndose demostrado en esta estructura contactos sinápticos sobre neuronas glutamatérgicas; véase Morales y Margolis, 2017). Estas neuronas también emiten proyecciones, pero menos numerosas, hacia la amígdala central, el núcleo del lecho de la estría terminal, el tálamo mediodorsal, el rafe dorsal y el núcleo mesencefálico profundo (DpMe), y escasas proyecciones a regiones de la corteza prefrontal y a las regiones *core* y *shell* del núcleo accumbens donde se han demostrado sinapsis con interneuronas colinérgicas (Morales y Margolis, 2017). La población de neuronas de proyección gabaérgicas se distribuye por todas las subdivisiones del VTA, pero se concentran más en la región lateral del VTA, y sobre ellas actúan varias drogas de abuso, como la nicotina, el alcohol, los opiáceos, las benzodiacepinas y el tetrahidrocannabinol (Taylor y cols., 2014). Los mecanismos que explican las propiedades adictivas de estas drogas tienen relación sobre todo con la inhibición local de las neuronas dopaminérgicas del VTA por parte de las neuronas gabaérgicas del VTA (Tan y cols., 2010; Tolu y cols., 2013), pero también se ha propuesto que estas drogas actúan por mecanismos independientes de la dopamina (Laviollete y cols., 2002). Las neuronas gabaérgicas de VTA están implicadas en el aprendizaje asociativo bien a través de proyecciones locales sobre neuronas dopaminérgicas del VTA que inducen aversión de lugar condicionado (Tan y cols., 2012) e interfieren con la recompensa (Van Zessen y cols., 2012), o bien a través de proyecciones a larga distancia sobre interneuronas colinérgicas del estriado (Brown y cols., 2012).

Poco después de identificarse la población de neuronas glutamatérgicas del VTA (Hur y Zaborszky, 2005; Kawano y cols., 2006; Yamaguchi y cols., 2007; Nair-Roberts y cols., 2008), diversos autores analizaron las proyecciones de estas neuronas y observaron que, al igual que las neuronas dopaminérgicas, proyectan al núcleo accumbens, a la corteza prefrontal medial y a otras estructuras límbicas (Yamaguchi y cols., 2007, 2011; Gorelova y cols., 2012; Hnasko y cols., 2012). El núcleo accumbens recibe más inervación dopaminérgica que glutamatérgica desde el VTA, mientras que en la corteza prefrontal medial ocurre lo contrario (Yamaguchi y cols., 2011; Gorelova y

cols., 2012). Las neuronas glutamatérgicas ubicadas en la parte medial del VTA y que muestran características electrofisiológicas características de las neuronas dopaminérgicas del VTA medial inervan preferentemente al núcleo accumbens, la corteza prefrontal medial, amígdala, pálido ventral y la habénula lateral (Hnasko y cols., 2012). El estudio de Taylor y colaboradores (2014) describió dos poblaciones de neuronas de proyección glutamatérgicas del VTA de ratón, una que coexpresa TH y vGluT2 y otra que expresa sólo vGluT2. Las neuronas que coexpresan TH/vGluT2, y por tanto podrían coliberar glutamato y dopamina, abundan en los núcleos de la línea media y porciones mediales de PN y PBP, y proyectan a la amígdala, el pálido ventral, el núcleo del lecho de la estría terminal, el núcleo preóptico magnocelular, el núcleo accumbens y la corteza prefrontal medial. En el núcleo accumbens, los axones de estas neuronas liberan glutamato sobre las neuronas espinosas de proyección de tamaño medio y sobre interneuronas, a la vez que coliberan dopamina (**Figura 6**; Stuber y cols., 2010; Tecuapetla y cols., 2010; Chuhma y cols., 2014; Zhang y cols., 2015; Morales y Margolis, 2017). En la corteza prefrontal medial estas proyecciones tienen un fuerte efecto excitatorio sobre las interneuronas que expresan parvalbúmina y, a través de ellas, inhiben a las neuronas piramidales de la corteza (Kabanova y cols., 2015; Morales y Margolis, 2017).

Las neuronas de proyección glutamatérgicas (expresan sólo vGluT2) se concentran en las regiones dorsal y medial del VTA e inervan intensamente a la habénula lateral, el pálido ventral, el núcleo del lecho de la estría terminal, el núcleo preóptico magnocelular y el tracto óptico (Taylor y cols., 2014). Estas proyecciones glutamatérgicas del VTA hacen sinapsis sobre neuronas glutamatérgicas de la habénula lateral y en el núcleo accumbens sinaptan sobre interneuronas gabaérgicas que expresan parvalbúmina (Morales y Margolis, 2017). Tanto las neuronas gabaérgicas como las glutamatérgicas del VTA hacen sinapsis sobre neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas del VTA (**Figura 7**; Omelchenko y Sesack, 2009; Taylor y cols., 2014; Morales y Margolis, 2017), pero se desconoce si estas neuronas también envían colaterales fuera del VTA.



**Figura 6. Organización ultraestructural de las sinapsis de neuronas de proyección del VTA en el núcleo accumbens.** Esquema que ilustra el axón de una neurona de proyección del VTA que expresa tirosina hidroxilasa (TH+) y transportador vesicular de glutamato de tipo 2 (vGluT2+) y que inerva el núcleo accumbens liberando dopamina y glutamato. La liberación de dopamina y glutamato se realiza desde vesículas independientes para cada neurotransmisor que se concentran en diferentes microdominios adyacentes dentro de un mismo axón y se liberan desde segmentos separados del mismo. Obsérvese que la sinapsis glutamatérgica es asimétrica, es decir, que visto con microscopio electrónico el engrosamiento postsináptico es más ancho que el presináptico. Imagen tomada de Morales y Margolis (2017). VMAT2: transportador vesicular de monoaminas de tipo 2.

Se ha visto que con excepción del hipocampo que recibe innervación dopaminérgica del VTA pero no proyecta al VTA ni a otros núcleos dopaminérgicos del mesencéfalo (Geisler y Zahm, 2005), las regiones que reciben proyecciones (dopaminérgicas, gabaérgicas o glutamatérgicas) desde el VTA envían a su vez proyecciones de vuelta al VTA (Geisler y Zahm, 2005; Watabe-Uchida y cols., 2012; Taylor y cols., 2015), y además muchas de estas áreas están también interconectadas (Geisler y Zahm, 2005). Las neuronas no dopaminérgicas del VTA proporcionan un importante *feedback* inhibitorio o desinhibitorio al VTA, mediante conexiones locales y a larga distancia (Taylor y cols., 2014), y la actividad de estas neuronas participa sustancialmente en el procesamiento de los estímulos de recompensa y refuerzo (Ikemoto, 2010; Morales y Margolis, 2017).

Una proyección importante para los comportamientos de recompensa es la mesohabenular, sobre la que inicialmente se propuso que era principalmente gabaérgica (Swanson, 1982; Del Fava y cols., 2007), posteriormente se determinó que

había un 50% de proyecciones dopaminérgicas a la hipófisis lateral (Gruber y cols., 2007), y, más recientemente, se ha demostrado que cerca del 90 % de las neuronas mesolímbicas coexpresan GAD y vGluT2 (Root y cols., 2014b). Las proyecciones gabaérgicas de VTA a la hipófisis lateral promueven la preferencia de lugar condicionado (*conditioned place preference*) (Stamatakis y cols., 2013) mientras que los impulsos glutamatergicos del VTA a la hipófisis lateral promueven aversión de lugar condicionado (Root y cols., 2014a). Las neuronas glutamatergicas de VTA también desempeñan cierto papel en la recompensa a través de sinapsis excitatorias locales sobre neuronas dopaminérgicas mesolímbicas (Wang y cols., 2015). También se ha visto que la activación optogenética de las fibras glutamatergicas mesolímbicas que proyectan a interneuronas gabaérgicas del núcleo accumbens promueven aversión (Qi y cols., 2016).



**Tabla 2.** Proyecciones eferentes del VTA

AÑO	AUTOR/ES	ESPECIE	ORIGEN	DIANA
1966	Anden y cols.	Rata	A10	Tu, Acb
1971	Ungerstedt	Rata	A10	Tu, Acb
1974	Fuxe y cols.	Rata	A10	Cx frontal límbica, aCg, Cx Ent,
1974	Lindvall y cols.	Rata	A10	Ce, BST, Cx frontal ipsi, aCg ipsi, Cx Ent
1978	Fallon y Moore	Rata	SN, vVTA	Acb, Septo, CPu
			SN, vVTA	Bulbo olfatorio, A
			aVTA	Cx frontal anteromedial
			pVTA	Cx Ent
			SN, mVTA	mCPu, núcleos mediales del prosencéfalo basal
			SN, IVTA	Cg anterior, Pir, Cx suprarrenal, ICPu, núcleos laterales del prosencéfalo basal
1979	Beckstead y cols.	Rata	VTA	Acb, Tu, vmCPu, LHb, tálamo (Re, CM, MD), PH, LH, PO, Ce, La, Me, BST, DBB, LS, Cx frontal, Cg, Cx Ent, PAG, MnR, DR, Pb, LC
1982	Swanson	Rata	VTA	Acb, LS, Cx límbica anterior (pre y supragenua), A, dHC, Cx Ent, LHb, Pb, LC
			vmVTA	LS, LHb, HC
1983	Albanese y Minciachi	Rata	PN	Cx frontal
			mVTA, IF	LS ipsi y contralateral
			vmVTA	Acb ipsi y contralateral
			IVTA	CPu
			dVTA	LHb
2000	Carr y Sesack	Rata	VTA (GABA)	Acb, mCPF
2007	Ikemoto	Rata	pmVTA, CLi	mTu, mAcbSh
			IVTA	AcbC, lAcbSh, ITu
2007	Del Fava y cols.	Rata	RLi	Tu, vIVP, MCPO, LH, MD, LHb, SuR, CPF, BL, DR
2008	Lammel y cols.	Ratón	mPN, vmPBP, IF	mCPF, BL, AcbC, mAcbSh
			PBP	lAcbSh
2011	Hosp y cols.	Rata	VTA (DA)	M1
2011	Yamaguchi y cols.	Rata	VTA (Glut)	CPF, Acb
2012	Gorelova y cols.	Rata	IF	mCPF bilateral
			RLi	CPF bilateral (capas 5 y 6)
			rVTA	CPF bilateral
			PBP	CPF (capas 5 y 6 de Cx infralímbica y prelímbica), AcbSh
2012	Hnasko y cols.	Ratón	mVTA	CPF, Acb, LHb, VP, A
			VTA (DA y Glut)	Acb
2013	Stamatakis y cols.	Ratón	VTA (GABA)	LHb
2014	Lammel y cols.	Ratón	pmVTA (PN y mPBP)	mCPF, BL, mAcbSh, AcbC
			aVTA, plVTA (IPBP)	lAcbSh
2014	Roots y cols.	Ratón	VTA	LHb
2014	Taylor y cols.	Ratón	VTA	VP, MCPO, LPO, LH, LHb, Ce, BST, MD, DR, DpMe, CPF, AcbSh, AcbC
			VTA (PN)	A, VP, BST, MCPO
			VTA (dVTA, mVTA)	LHb, VP, BST, MCPO, tracto óptico
2017	Rodríguez-López y cols.	Ratón	PBP, PN, rVTA, VTT, IF; RLi, CLi	AcbSh, AcbC

Prefijos (en minúsculas). a: anterior; d: dorsal; l: lateral; m: medial; p: posterior; pl: posterolateral; pm: posteromedial; v: ventral; vm: ventromedial.

Cx: corteza; Glut: glutamato; HC: hipocampo; ipsi: ipsilateral; La: núcleo amigdalino lateral; MCPO: núcleo preóptico magnocelular; Pb: núcleo parabraquial; PO: región preóptica; SuR: región supraoculomotora. Para el resto de abreviaturas véase la Lista de Abreviaturas.

## 1.4 PROYECCIONES AFERENTES AL VTA

Los primeros estudios sobre las proyecciones aferentes al VTA (**Tabla 3**) consistieron en experimentos de degeneración anterógrada realizados en los años 50 y 60 del siglo XX (Nauta, 1956; Guillery, 1957; Wolf y Sutin, 1966), los cuales señalaron que las aferencias al VTA proceden del área septal (Nauta, 1956), la región hipotalámica lateral (Guillery, 1957; Wolf y Sutin, 1966), área preóptica lateral (Nauta, 1958) y la habénula (Agaki y Powell, 1968). Estudios autorradiográficos posteriores confirmaron estas proyecciones (Swanson, 1976; Arbuthnott y cols., 1976; Herkenham y Nauta, 1979) y proporcionaron evidencias de proyecciones aferentes al VTA procedentes de la sustancia innominada (SI) (Swanson, 1976; Meibach y Siegel, 1977), banda diagonal de Broca, el núcleo del lecho de la estría terminal, área preóptica medial, hipotálamo anterior (Swanson, 1976; Conrad y Pfaff, 1976a, b; Meibach y Siegel, 1977) y los núcleos del rafe dorsal y mediano (Conrad y cols, 1974; Pierce y cols, 1976).

A finales de los años 70 del siglo XX, el empleo de trazadores retrógrados permitió precisar mejor el origen de las aferencias al VTA ya conocidas y descubrir otras nuevas. Así, Phillipson publicó en 1979 uno de los trabajos más completos que existen sobre las proyecciones del VTA de la rata (Phillipson, 1979c). Este autor realizó inyecciones iontoforéticas del trazador retrógrado peroxidasa del rábano (HRP) en el VTA y obtuvo marcaje en la corteza prefrontal, lado dorsal del surco rinal, núcleo accumbens, sustancia innominada, el núcleo del lecho de la estría terminal, amígdala, banda diagonal de Broca, área preóptica magnocelular, áreas preópticas medial y lateral, hipotálamo anterior, lateral y posterodorsal, habénula lateral, núcleo parafascicular del tálamo, colículo superior, núcleo dorsal del rafe, núcleos del rafe (magno y del puente), núcleos parabraquiales dorsal y ventral, *locus coeruleus*, núcleos cerebelosos profundos. Este mismo autor también estudió las proyecciones aferentes al IF empleando el mismo sistema y observó que procedían sobre todo de la habénula medial y de los núcleos del rafe medio (Phillipson, 1979c).

Simon y colaboradores (1979) estudiaron las proyecciones aferentes del VTA mediante el trazador retrógrado HRP, y observaron aferencias ipsilaterales al VTA procedentes de la sustancia negra, los núcleos del rafe mediano y dorsal, el núcleo

tegmental de Gudden, la habénula lateral y los núcleos cerebelosos interpósito y dentado, y aferencias contralaterales procedentes del *locus coeruleus*. Estos autores también demostraron que existían conexiones recíprocas entre el VTA-A10 y los núcleos del rafe, el *locus coeruleus* y el cerebelo, resaltando la importancia de estas proyecciones en la modulación de la actividad de las neuronas del VTA-A10 (Simon y cols., 1979).

Los primeros trabajos sobre las proyecciones aferentes del VTA (Guillery, 1957; Nauta, 1958) describieron dos sistemas o haces principales de fibras: el fascículo telencefálico medial, a través del cual viajan los axones de estructuras límbicas del prosencéfalo, y el pedúnculo mamilar formado por las proyecciones ascendentes desde los núcleos de Gudden, el rafe dorsal y medial y el *locus coeruleus*. Swanson explicó que las proyecciones que surgían de la corteza límbica anterior (corteza prefrontal) y del núcleo ventromedial del hipotálamo invocaban la parte medial del VTA, donde se concentraban las neuronas que proyectaban al septo y a la habénula (Swanson, 1982). Se postuló que estas proyecciones podían mediar la influencia indirecta de la amígdala sobre el septo y la habénula ya que el núcleo ventromedial del hipotálamo recibe una importante proyección desde la amígdala. La región rostral del VTA recibe aferencias del septo lateral, del área preóptica medial y del núcleo del lecho de la estría terminal. Aunque el significado funcional de estas aferencias a la región rostral del VTA no se conocía exactamente, Swanson (1982) destacó que la región del VTA que recibía aferencias del área preóptica medial y del septo lateral, invocaban fundamentalmente al núcleo accumbens, lo que podía explicar el camino multisináptico desde el área preóptica medial al núcleo accumbens, a través del VTA, proyecciones involucradas en la regulación de la sed (Swanson y Mogenson, 1981). Otras estructuras como el núcleo accumbens (Nauta y cols., 1978), el núcleo preóptico magnocelular, el área preóptica lateral (Swanson y Mogenson, 1981) y el área hipotalámica lateral (Saper y cols., 1979) invocaban de forma difusa todo el VTA, sin mostrar una preferencia por ninguna zona concreta. Las proyecciones aferentes a los núcleos mesencefálicos de la línea media (central o caudal linear, rostral linear e interfascicular), proceden de la corteza límbica anterior (Beckstead, 1979), el núcleo del lecho de la estría terminal (Swanson y cols., 1979), el núcleo preóptico magnocelular (Swanson, 1976) y el núcleo ventromedial del hipotálamo (Saper y cols., 1976).

El trabajo de revisión del VTA realizado por Oades y Halliday (1987) clasificó las proyecciones aferentes al VTA en tres grupos: rombencefálicas, diencefálicas y telencefálicas. En las aferencias rombencefálicas incluyeron las proyecciones serotoninérgicas desde los núcleos del rafe (dorsal, magno y del puente), las proyecciones catecolaminérgicas desde los grupos A1, A5, A6 o *locus coeruleus*, A7 y A9 o SN (Phillipson, 1979c), y la de los núcleos cerebelosos dentado e interpósito (Phillipson, 1979c), núcleo interpenduncular posterior, núcleos vestibulares, núcleo cuneiforme, núcleo grácil, núcleo espinal trigeminal y núcleos oculomotores (Tork y cols., 1984). Las principales aferencias diencefálicas al VTA proceden de la habénula lateral y del hipotálamo lateral (Phillipson, 1979c), aunque en menor medida también contribuían los núcleos preópticos lateral y medial, el núcleo talámico parafascicular, las áreas hipotalámicas anterior, posterodorsal y ventromedial (Phillipson, 1979c) y los núcleos mamilares medial y lateral (Tork y cols., 1984). Las aferencias telencefálicas al VTA proceden del núcleo del lecho de la estría terminal, la banda diagonal de Broca, la sustancia innominada, los núcleos amigdalinos anterior, basal y central, el núcleo accumbens (Phillipson, 1979c; Tork y cols., 1984), el CPu (Fallon y cols., 1985), las cortezas cingular, suprarinal, infralímbica (área 25), frontal medial (área 32), y los núcleos septales lateral y medial (MS) (Nauta, 1956; Maeda y Mogenson, 1981). La mayoría de las proyecciones aferentes al VTA desde el tronco del encéfalo son recíprocas, así como también lo son las procedentes del núcleo del lecho de la estría terminal, la banda diagonal de Broca, la sustancia innominada, los núcleos amigdalinos anterior, basal y central, el núcleo accumbens, el CPu, las cortezas cingular, suprarinal, infralímbica (área 25), y frontal medial (área 32) y el septo lateral.

En 2005, Geissler y Zahm realizaron otro estudio relevante sobre las proyecciones aferentes al VTA de ratas empleando el trazador retrógrado Fluorogold de mayor sensibilidad, que fue inyectado en diferentes regiones del VTA mediante iontoforesis con una intensidad baja y discontinua para reducir el daño de los axones y, por lo tanto, evitar la captación del trazador por axones de paso. Para confirmar los datos obtenidos con el marcaje retrógrado, se realizaron inyecciones de los trazadores anterógrados *Phaseolus vulgaris* leucoaglutinina (PHA-L) o amino dextrano biotinilado (BDA) en 14 estructuras del prosencéfalo que habían sido marcadas retrógradamente a

partir de las inyecciones de Fluorogold en el VTA. Estos autores clasificaron las proyecciones aferentes al VTA en descendentes, aquellas que procedían de estructuras cerebrales ubicadas rostralmente al VTA, y ascendentes, las originadas en estructuras situadas al mismo nivel que VTA o más caudales. Las principales aferencias descendentes proceden de la corteza prefrontal, septo lateral y medial, banda diagonal de Broca, la región *shell* del accumbens, el pálido ventral, las áreas preópticas lateral y medial, el área hipotalámica lateral y la habénula lateral. En este estudio se describieron por primera vez proyecciones aferentes al VTA desde el complejo núcleo endopiriforme dorsal (DEn) - claustró (Cl), varios núcleos hipotalámicos mediales [paraventricular (PV), ventromedial, perifornical], *tuber cinereum* y área hipotalámica dorsal. En cuanto a las principales aferencias ascendentes se originan en el núcleo dorsal del rafe, la sustancia gris periacueductal, la formación reticular mesencefálica y pontina. Describieron también nuevas proyecciones aferentes ascendentes desde diferentes núcleos del tronco del encéfalo como el tegmental laterodorsal (LDTg), el pedunculopontino, el rafe paramediano (PMnR) y el campo reticular intermedio y gigantocelular. No se pudo establecer ninguna topografía en las proyecciones aferentes, ya que éstas se distribuyen de forma difusa por todo el VTA, dejando una escasa arborización axonal, excepto en el caso del núcleo accumbens en el que de su polo rostral surgen abundantes proyecciones a la región lateral del VTA (Zahm y Heimer, 1993). Además, Geissler y Zahm (2005) observaron que la región medial de VTA es inervada desde la región dorsomedial del *shell* del núcleo accumbens, mientras que las regiones más laterales del VTA reciben aferencias de zonas más ventrales y laterales del *shell* del núcleo accumbens. Otro dato novedoso aportado por el estudio de Geissler y Zahm (2005) es que las proyecciones aferentes al VTA suelen ser bilaterales. Además, estos autores destacaron el hecho de que las aferencias descendentes al VTA también inervan otras estructuras que a su vez proyectan al VTA, lo que indica que existe una red interconectada de aferencias al VTA (Geissler y Zahm, 2005). Por ejemplo el núcleo accumbens envía proyecciones directas al VTA, como se ha explicado anteriormente, pero a través del pálido ventral, el área preóptica lateral y el área hipotalámica lateral también inerva indirectamente al VTA.

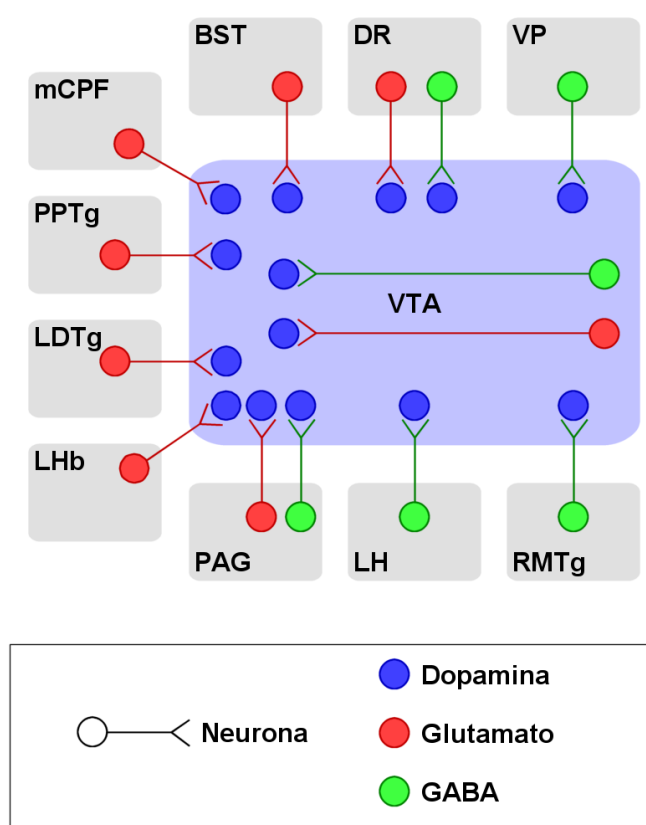
A partir de los 90 se comenzó a analizar el fenotipo neuroquímico de las proyecciones aferentes al VTA (Kalivas, 1993; Carr y Sesack, 2000; Geisler y cols., 2007)

gracias a la combinación de trazadores retrógrados y técnicas de hibridación *in situ* para identificar el mRNA de proteínas como la GAD en las neuronas gabaérgicas, el vGluT para las glutamatérgicas y la TH para las dopaminérgicas. Kalivas (1993) identificó en ratas aferencias gabaérgicas desde la región *shell* del núcleo accumbens, la región rostral ventromedial del pálido ventral, la banda diagonal de Broca y el septo lateral. Geisler y colaboradores (2007) estudiaron las proyecciones aferentes glutamatérgicas al VTA y concluyeron que casi todas las estructuras que inervan el VTA envían axones glutamatérgicos, excepto el núcleo accumbens y el septo lateral. Las proyecciones aferentes glutamatérgicas positivas para vGluT1 se concentraron casi exclusivamente en la corteza prefrontal, sobre todo en su región prelímbica (PrL) y dorsopeduncular, mientras que las aferencias glutamatérgicas positivas para vGluT2 se repartieron por diversas estructuras subcorticales (áreas hipotalámica lateral y preóptica, hipotálamo medial, pálido ventral, habénula lateral, septo medial y banda diagonal de Broca, sustancia gris periacueductal, sustancia gris central, formación reticular pontina y mesencefálica, núcleos tegmentales pedunculopontino y laterodorsal, núcleo parabraquial, núcleo cuneiforme y núcleo mediano del rafe). Las proyecciones aferentes glutamatérgicas positivas para vGluT3 se situaron preferentemente en los núcleos del rafe dorsal y mediano.

Como se ha indicado en el apartado 1.3, los estudios más recientes del VTA establecen de manera muy clara y convincente que el VTA de roedores se compone de subpoblaciones de neuronas caracterizadas por utilizar uno o varios neurotransmisores, por tener distintas proyecciones aferentes y eferentes, y por estar involucradas de manera diferente en los mecanismos de recompensa o aversión (Faget y cols., 2016; Bariselli y cols., 2016; Morales y Margolis, 2017). Estos estudios emplean en lugar de los trazadores clásicos, vectores virales que han sido desarrollados para infectar tipos celulares concretos definidos genéticamente y extenderse transinápticamente para marcar las proyecciones aferentes (Callaway, 2008; Watabe-Uchida y cols., 2012; Faget y cols., 2016).

Faget y colaboradores (2016) determinaron en ratones que las proyecciones aferentes que reciben las neuronas dopaminérgicas, gabaérgicas y glutamatérgicas del VTA desde el hipotálamo lateral, los núcleos del rafe y el pálido ventral, son similares

cualitativamente. Sin embargo, las proyecciones al VTA desde el estriado y el globo pálido proporcionan mayor inervación sobre las neuronas dopaminérgicas, mientras que las que proceden de la corteza cerebral inervan preferentemente a neuronas glutamatérgicas del VTA. Las neuronas gabaérgicas del VTA reciben proporcionalmente más proyecciones aferentes desde la habénula lateral y el núcleo tegmental laterodorsal.



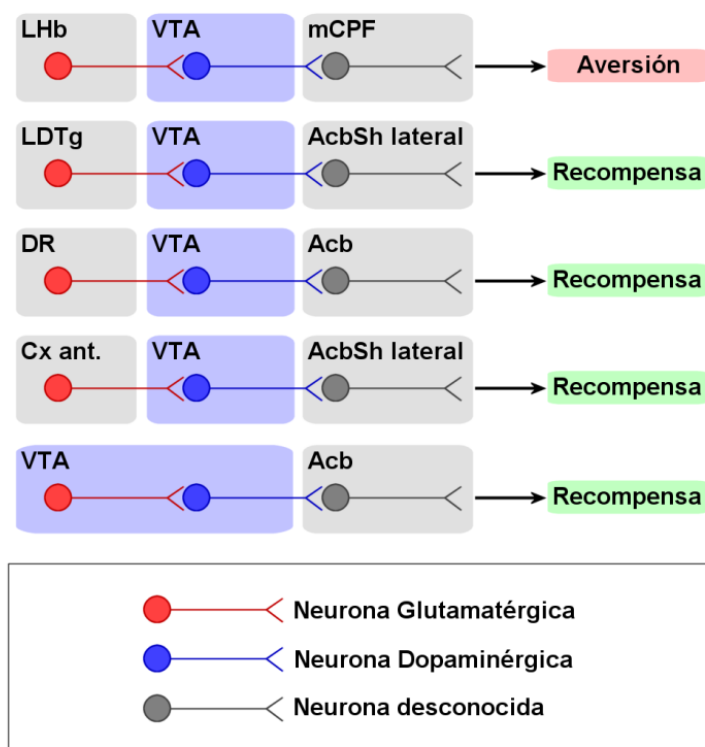
**Figura 7. Proyecciones aferentes a las neuronas dopaminérgicas del VTA confirmadas a nivel sináptico.** Esquema que resume las conexiones sinápticas que han sido detectadas anatómicamente (utilizando microscopio electrónico) o funcionalmente (usando optogenética junto con electrofisiología *ex vivo*). Las neuronas dopaminérgicas del VTA reciben proyecciones aferentes glutamatérgicas desde la corteza prefrontal medial (mCPF), el tegmento pedunculo pontino (PPTg), el núcleo tegmental laterodorsal (LDTg), la habénula lateral (LHb), la sustancia gris periacueductal (PAG), el núcleo del lecho de la estría terminal (BST) y el núcleo dorsal del rafe (DR) y aferencias gabaérgicas desde el núcleo tegmental mesopontino rostromedial (RMTg), la PAG, el DR, el hipotálamo lateral (LH) y el pálido ventral (VP). Las neuronas dopaminérgicas del VTA también reciben proyecciones aferentes locales de neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas del VTA. Imagen modificada de Morales y Margolis (2017).

Las principales aferencias glutamatérgicas a las neuronas dopaminérgicas de VTA (**Figura 7**) proceden de las cortezas prefrontal medial, orbitofrontal e insular (Tong y cols., 1996; Beier y cols., 2015), núcleo subtalámico (STh) (Chergui y cols., 1994), núcleo

tegmental laterodorsal (Lammel y cols., 2012), núcleo del lecho de la estría terminal (Georges y Aston-Jones, 2002), habénula lateral (Lammel y cols., 2012) y núcleo dorsal del rafe (Qi y cols., 2014). Las aferencias desde la corteza cerebral a las neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan al núcleo accumbens promueven el aprendizaje por refuerzo, y las aferencias que proceden del núcleo lateral tegmental dorsal y del núcleo dorsal del rafe promueven la preferencia de lugar condicionada (*Conditioned place preference*) (**Figura 8**; véase Morales y Margolis, 2017). Por el contrario, la estimulación desde la habénula lateral a las neuronas dopaminérgicas del VTA es aversiva e induce aversión de lugar condicionada (*Conditioned place aversion*). Las principales proyecciones aferentes inhibitorias a las neuronas dopaminérgicas del VTA (**Figura 7**) proceden del pálido ventral (Malher y cols., 2014) y del núcleo tegmental rostromedial/cola de VTA (Jhou y cols., 2009a, b; Lecca y cols., 2012), y ejercen un importante control de la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA. Las neuronas dopaminérgicas que reciben estas aferencias y se sitúan en la región posterior y medial de VTA, proyectan a la corteza prefrontal, amígdala basolateral, la parte medial del *shell* del accumbens y la región *core* del accumbens (Lammel y cols., 2014). Sin embargo las neuronas dopaminérgicas del VTA ubicadas en la región rostralateral de VTA inervan principalmente la parte lateral del *shell* del accumbens (Lammel y cols., 2014).

Las neuronas gabaérgicas del VTA reciben proyecciones aferentes glutamatérgicas y otras gabaérgicas desde el núcleo del lecho de la estría terminal (Jennings y cols., 2013). En estudios donde se produce la activación optogenética de estas aferencias se ha comprobado que las de naturaleza glutamatérgicas inducen aversión de lugar condicionada y promueven comportamientos ansiosos, mientras que las gabaérgicas inducen preferencia de lugar condicionada y generan recompensa y efectos ansiolíticos (Jennings y cols., 2013; véase Morales y Margolis, 2017). Las neuronas de proyección espinosas medianas del núcleo accumbens forman sinapsis inhibitorias sobre las neuronas gabaérgicas de VTA y su estimulación provoca preferencia de lugar condicionada (Bocklisch y cols., 2013).





**Figura 8. Proyecciones aferentes y eferentes observadas a nivel sináptico de neuronas dopaminérgicas del VTA implicadas en los mecanismos de recompensa y aversión.** El esquema resume el origen de las aferencias glutamatérgicas que hacen sinapsis con neuronas dopaminérgicas del VTA que se han demostrado que participan en los mecanismos de recompensa o aversión. Se muestran también las posibles estructuras inervadas por estas neuronas dopaminérgicas que median los efectos de recompensa o aversión. Figura tomada de Morales y Margolis, 2017.

Cx ant: corteza cerebral anterior; mCPF: corteza prefrontal medial. Para el resto de abreviaturas véase la Lista de Abreviaturas.

**Tabla 3.** Proyecciones aferentes del VTA

AÑO	AUTOR/ES	ESPECIE	ORIGEN	DIANA
1956	Nauta	Rata	Área septal	VTA
1957	Guillery	Rata	LH	VTA
1958	Nauta	Gato	LPO	VTA
1966	Wolf y Sutin	Rata	LH	VTA
1968	Agaki y Powell	Gato	Habénula	VTA
1974	Conrad y cols.	Rata	DR, MnR	VTA
1976	Swanson	Rata	PO, SI	VTA
1976	Conrad y Pfaff	Rata	MPO, AHA	VTA
1977	Meibach y Siegel	Rata	HDB	VTA
1978	Nauta y cols.	Rata	Acb	VTA
1978	Saper y cols.	Rata	LH	VTA
1979	Herkenham y Nauta	Rata	LHb	VTA
1979	Phillipson	Rata	CPF, surco rinal, Acb, SI, BST, A, DBB, MCPO, MPO, AHA, LH, PHD, LHb, PF, Su, DR, RMg, PnR, vPB, dPB, LC, nu.cerebelosos profundos MnR, MHb	VTA, A10 IF
1979	Simon y cols.	Rata	Ipsilateral: SN, MnR, DR, nu. de Gudden, LHb, Int, nu. dentado Contralateral: LC	VTA-A10
1982	Swanson	Rata	DR, MnR, LC, Pb, Acb, MCPO, LPO, LH CPF, VMH LS, MPO BST Cx límbica anterior, BST, MCPO, VHM	VTA mVTA rvVTA rVTA CLi, RLi, IF
1984	Tork y cols.	Gato	Núcleos del rafe, LC, tegmento pontino, pIP, nu. vestibular, CnF, nu. grácil, nu. espinal trigeminal, hipotálamo, nu. mamilares medial y lateral	VTA
1985	Fallon y cols.	Rata	CPu	VTA
1993	Zahm y Heimer	Rata	rAcb	IVTA
1993	Kalivas y cols.	Rata	AcbSh, VP, DBB, LS	VTA
2000	Carr y Sesack	Rata	CPF	ne. DA (mesocortical) ne. GABA (mesoaccumbal)
2005	Geisler y Zahm	Rata	DP, PrL, IL, AI, LSD, LSV, LSI, MS, SFi, DBB, AcbSh, AcbC, rAcb, BST, VP, Tu, AA, Me, Ce, SI, LPO, MPO, MCPO, AHA, LH, LHb, MHb, DEn, Cl, PaHT, VMH, PeF, Tc, DH, SuMM, ZI, PF, PV, Su, PAG, SNC, SNR, DpMe, DTg, DR, FT mesencefálica, FT pontina, FT intermedia, FT gigantocelular, LDTg, PdP, PMnR, MnR, PnR, LC, Pb, CnF	VTA
2007	Geisler y cols.	Rata	ne. Glut: CPF (PrL, DP), LH, PO, MH, PV, LHb, MS, DBB, PAG, CG, FT pontina y mesencefálica, PdP, LDTg, Pb, CnF, MnR, DR, MnR	VTA

Prefijos (en minúsculas). l: lateral; m: medial; p: posterior; r: rostral.

AA: área amigdalina anterior; CG: sustancia gris central; CnF: núcleo cuneiforme; Cx: corteza; DH: área hipotalámica dorsal; FT: formación reticular; IL: corteza infralímbica; Int: núcleo interpósito del cerebelo; LSV: núcleo septal lateral parte ventral; MCPO: Núcleo preóptico magnocelular; MH: Hipotálamo medial; MPO: núcleo preóptico Medial; ne: neurona; ne. DA: neurona dopaminérgica; ne. GABA: neurona gabaérgica; ne. Glut: neurona glutamatérgica; nu: núcleo; PaHT: núcleo paraventricular hipotalámico; Pb: núcleo parabraquial; PdP: núcleo pedunculopontino; PeF: núcleo perifornical hipotalámico; PF: núcleo parafascicular; PHD: hipotálamo posterior parte dorsal; PnR: núcleo pontino del rafe; PO: región preóptica; RMg: núcleo magno del rafe; SFi: núcleo septofimbrial; SN: sustancia negra; Su: colículo superior; Tc: tuber cinereum; VMH: núcleo hipotalámico ventromedial.

## **PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**

---

El VTA comprende un grupo anatómico y bioquímicamente heterogéneo de neuronas que inervan extensas regiones cerebrales. Entre sus proyecciones destacan dos importantes sistemas de proyección, mayoritariamente dopaminérgicos, a estructuras del sistema límbico y a amplias regiones de la corteza cerebral – sistemas conocidos como mesolímbico y mesocortical - cuya disfunción está muy relacionada con la fisiopatología de enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia y la depresión. El VTA también es una estructura fundamental en los circuitos neurales relacionados con la recompensa y la motivación, y por lo tanto, en los mecanismos anatomofisiológicos implicados en la adicción a las drogas de abuso (Berridge y Robinson, 1998; Salamone y Correa, 2002; Wise, 2002; Ungless, 2004; Ranaldi, 2014).

El VTA es una región que engloba varios núcleos o subdivisiones, existiendo discrepancia entre autores sobre la composición nuclear de este territorio medial del mesencéfalo ventral. Entre las subdivisiones consideradas unánimemente integrantes del VTA destacan el núcleo parabraquial pigmentado y el núcleo paranigral. Otras subdivisiones como, por ejemplo, la región rostral del VTA, el área parafascicular retrorrefleja, el núcleo parapeduncular, el núcleo parainterfascicular o la cola del área tegmental ventral, no son reconocidas por todos los autores, y los límites de estas subdivisiones no están del todo claros en roedores (Ikemoto, 2007; Paxinos y Watson, 2007; Franklin y Paxinos, 2007; Fu y cols., 2012; Barrot y cols., 2012).

Otro aspecto fundamental para entender el VTA es la riqueza bioquímica que caracteriza a sus neuronas. A diferencia de la SNC, donde la mayoría de sus neuronas son dopaminérgicas, el VTA alberga una importante población gabaérgica (que supone un 33%) y una pequeña población glutamatérgica (2-3%). Además, estudios bastante recientes (Bariselli y cols., 2016; Barker y cols., 2016) han demostrado la coexistencia de varios neurotransmisores en las mismas neuronas de VTA, de forma que existen neuronas que coexpresan tanto TH como proteínas involucradas en el metabolismo de GABA o glutamato, lo que indica que estas neuronas pueden liberar DA y otros aminoácidos neurotransmisores (Stuber y cols., 2010; Stamatakis y cols., 2013; Bariselli y cols., 2016; Morales y Margolis, 2017).

Las proyecciones eferentes del VTA se comenzaron a estudiar a finales de los años 60, aunque fue a partir de los 70 cuando gracias al empleo de trazadores retrógrados y anterógrados, como los aminoácidos tritiados y la HRP, solos o combinados con inmunohistoquímica frente a la tirosina hidroxilasa, inyectados de forma bastante masiva en el VTA, permitieron conocer las extensas proyecciones que tienen origen en este territorio. Inicialmente, los trabajos se centraron en estudiar estas proyecciones considerando el VTA como una única estructura, es decir, sin tener en cuenta sus diversas subdivisiones (Fallon y Moore, 1978; Beckstead y cols., 1979, Swanson, 1982; Oades y Halliday, 1987; Domesick, 1988). La disponibilidad de nuevos métodos de inyección más controlados como la iontoforesis, y nuevos trazadores, como el BDA o la PHA-L, permitieron realizar un análisis más preciso de las proyecciones eferentes de subdivisiones concretas del VTA en ratas (Del Fava y cols., 2007; Ikemoto, 2007; Gorelova y cols., 2012) pero este tipo de estudios son prácticamente inexistentes en ratones. Investigaciones más detalladas sobre la morfología de los axones de neuronas de proyección dopaminérgicas se han centrado sobre todo en la sustancia negra compacta, en la que se han empleado inyecciones yuxtacelulares de BDA (Gauthier y cols., 1999; Prensa y cols., 2001) y, más recientemente, vectores virales como el Sindbis-pal-GFP (Matsuda y cols., 2009) para visualizar las neuronas. Sin embargo hasta la fecha no existe ningún estudio de reconstrucción axonal de células individuales del VTA.

Este trabajo de Tesis Doctoral fue planteado precisamente para aportar información sobre las proyecciones eferentes de subdivisiones concretas del VTA y para analizar por primera vez la morfología de los axones de neuronas del VTA del ratón. Para ello, este estudio se diseñó mediante un doble abordaje metodológico, de forma que inicialmente se planteó hacer un estudio poblacional de las proyecciones eferentes de las subdivisiones del VTA y, después, analizar a nivel de célula única los patrones de ramificación de los axones de neuronas del VTA. El primer estudio se realizó con inyecciones restringidas de BDA y el análisis de la ubicación de los campos axónicos terminales y el segundo mediante la transfección de neuronas individuales con el vector viral Sindbis-pal-GFP que promueve la expresión de GFP y la reconstrucción de su arborización axónica.

En concreto, los objetivos planteados son los siguientes:

- 1.** Estudio poblacional de las proyecciones eferentes de las principales subdivisiones del VTA del ratón.
- 2.** Estudio a nivel de célula única de los patrones de arborización axonal de neuronas del VTA. Este estudio abordará los siguientes aspectos:
  - 2a.** Determinar la posible naturaleza dopaminérgica de las neuronas marcadas mediante la determinación de su expresión de la TH.
  - 2b.** Analizar la trayectoria de los axones individuales mediante su reconstrucción completa
  - 2c.** Determinar las regiones inervadas por los axones reconstruidos y estimar mediante estereología la longitud de axón que proporcionan en algunas de sus principales estructuras diana.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### **3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

En este estudio se han utilizado 99 ratones macho adultos de la cepa C57BL/6, con un peso que oscilaba entre los 26 y los 33 gramos. En 39 ratones se hicieron microdepósitos del trazador anterógrado BDA en el VTA de ambos hemisferios y en los 60 restantes se inyectó bilateralmente en el VTA el vector viral Sindbis-pal-GFP para obtener neuronas individuales marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP).

Todos los procedimientos realizados en los animales se llevaron a cabo de acuerdo con el Real Decreto 53/ 2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos incluyendo la docencia y de acuerdo con la Ley 6/2013 de 11 de junio que complementa el Real Decreto 53/2013 en el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Tal y como especifica el Real Decreto 53/2013, los experimentos realizados en los animales han sido llevados a cabo por personas que poseen la acreditación necesaria (Categorías B y C).

### **3.2 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO**

El procedimiento quirúrgico empleado para realizar los microdepósitos de BDA y las inyecciones de los pseudoviriones Sindbis-pal-GFP en los ratones fue similar.

Antes de iniciar la cirugía los animales fueron anestesiados mediante una mezcla de 0,3 ml de ketamina (Imalgène 500, 100 mg/Kg), 0,2 ml de xilacina (Rompún 2%, 4-8 mg/Kg) y 0,5 ml de suero salino, administrada por vía intraperitoneal (0,45 ml de solución por 100 g de peso corporal). Tras la inducción anestésica intraperitoneal, se rasuraba la cabeza del animal y cuando se alcanzaba el nivel anestésico adecuado, comprobándolo mediante la ausencia del reflejo corneal y del reflejo de retirada, se fijaba la cabeza del animal en el marco de estereotaxia (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, Estados Unidos), introduciendo un vástago metálico en cada uno de los



conductos auditivos externos del animal (4 mm aproximadamente en cada lado) y asegurándonos de que la cabeza quedaba bien fijada.

Los ojos de los animales se protegieron con vaselina para evitar úlceras corneales por exposición y la zona de la incisión se desinfectaba con clorhexidina. Se mantenía a los animales en situación de homotermia mediante una manta de agua caliente (modelo TP 500, Gaymar Industries, Inc, Nueva York, Estados Unidos). Durante toda la cirugía, los animales se mantuvieron bajo anestesia inhalatoria mediante una mezcla de oxígeno e isoflurano (0,5 l/minutos de oxígeno y 0,5 l/minutos de isoflurano) a través de una mascarilla adaptada para ratones conectada a un circuito de anestesia y unida al aparato de estereotaxia (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA).

En la línea media de la piel del cráneo del ratón, entre los dos conductos auditivos externos, se realizaba una incisión de 1,5-2 cm de longitud con un bisturí. Tras separar la piel se localizaba bregma y bajo visión microscópica (microscopio quirúrgico modelo OPMI 1, Carl Zeiss, Overkochen, Alemania) y ayudados de la punta de una micropipeta vacía se tomaron las coordenadas del punto bregma. Guiándonos por el atlas estereotático de ratón de Franklin y Paxinos (2007), según el cual el VTA se localiza entre 0,24 y 1,08 mm lateral a la línea media en el plano mediolateral, entre -2,80 y -3,88 mm posterior a bregma en el plano anteroposterior y entre -4 y -4,85 mm ventral a la superficie pial en el plano dorsoventral (**Figura 9**). Según la subdivisión del VTA en la que se fuera a inyectar el trazador, se realizaron trépanos con la ayuda de una fresa dental (modelo MH-170, Foredom, Bethel, Connecticut, Estados Unidos) en distintas coordenadas del cráneo, tal y como se especifica a continuación.

Aq: acueducto; CGPn: sustancia gris central de la protuberancia; df: fórnix dorsal; DG: giro dentado; DK: núcleo de Darkschewitsch; DM: núcleo hipotalámico dorsomedial; DS: subículo dorsal; InC: núcleo intersticial de Cajal; MG: núcleo geniculado medial; mlf: fascículo longitudinal medial; mRT: formación reticular mesencefálica; mtg: tracto mamilotegmental; pc: comisura posterior; PF: núcleo talámico parafascicular; PH: núcleo hipotalámico posterior; Pi: glándula pineal; PIL: núcleo talámico intralaminar posterior; PnC: núcleo reticular pontino, parte caudal; PoT: grupo nuclear talámico posterior, parte triangular; PT: núcleo talámico paratenial; R: núcleo rojo; RMC: núcleo rojo, parte magnocelular; RPC: núcleo rojo, parte parvocelular; RSD: corteza retrosplenial disgranular; RSGa: corteza retrosplenial granular, región a; RSGb: corteza retrosplenial granular, región b; scc: esplenio del cuerpo calloso; SG: núcleo talámico supragenículado; SNCD: sustancia negra, pars compacta, tier dorsal; SNL: sustancia negra, parte lateral; Su: colículo superior; V1: corteza visual primaria; V2: corteza visual secundaria; VM: núcleo talámico ventromedial; VMH: núcleo hipotalámico ventromedial. Para el resto de abreviaturas véase la Lista de Abreviaturas.

en las coordenadas: -3,5 mm en el plano anteroposterior, 0,36 mm en el plano mediolateral y -4,6 mm en el plano dorsoventral. Para las inyecciones en rVTA las coordenadas utilizadas fueron: -3 mm anteroposterior, 0,5 mm mediolateral, y -4,5 mm dorsoventral, y para las inyecciones en VTT se usó como coordenada anteroposterior -4 mm, 0,36 mm como coordenada mediolateral y -4,5 mm como coordenada dorsoventral.

Los microdepósitos se conseguían depositando una pequeña cantidad de BDA al 3% en 0,5M de acetato potásico (**Solución 1**) mediante una micropipeta de vidrio (Ref. 1B150F-4, World Precision Instruments, Inc, Sarasota, Florida, USA) con diámetro externo de punta de 3-5  $\mu\text{m}$ , conectada a un generador de iontoforesis (Units ION 100-T and PS-100, Dagan Corporation, Minneapolis, Minnesota, USA).

El diámetro de las puntas de las micropipetas de vidrio se elaboraba utilizando un estirador de capilares (Model 700C, David Kopf Instruments, Tujunga, California, USA) y posteriormente se ajustaba manualmente el tamaño del diámetro de la punta gracias a un microscopio óptico dotado de objetivos de larga distancia y un ocular graduado, rompiéndola con un trozo de vidrio perfectamente pulido hasta que alcanzaba un diámetro de 3-5  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, las micropipetas se cargaban con BDA al 3% depositándolas en un eppendorf que contenía este trazador para que se rellenasen por capilaridad. Si la carga no era suficiente, se completaba introduciendo el BDA mediante un capilar (Microfil 34 AWG MF 34G-5, World Precisión Instrument) y antes de iniciar la inyección se observaba la punta de la micropipeta con un microscopio a 10X para comprobar que no contenía burbujas de aire que pudieran impedir la salida del trazador.

La micropipeta cargada se colocaba en la torre del aparato de estereotaxia y se tomaban nuevamente las coordenadas de bregma; referencia a partir de la cual se calculaban las coordenadas de la subdivisión del VTA en la que se iba a inyectar. Una vez introducida la punta de la pipeta en la estructura diana, se medía la impedancia que era de entre 10 y 20 M $\Omega$  si no se había producido ninguna obstrucción o rotura de la punta. Se introducía en la pipeta un electrodo de plata en contacto permanente con la solución del trazador y se conectaba a un generador de iontoforesis (Units ION 100-T and PS-100,

Dagan Corporation, Minneapolis, Minnesota, USA) mediante una pinza que contacta con el electrodo de plata y actúa como polo positivo, mientras que el polo negativo se consigue colocando una pinza de cocodrilo en la piel del ratón.

El trazador fue inyectado mediante pulsos de corriente positiva a una intensidad en torno a 350 nA, a una frecuencia de pulso de  $5 \times 10^{-1}$  segundos (1 segundo *on* y 1 segundo *off*) y durante un tiempo de 30 minutos. En los casos en los que la pipeta se obstruyó parcialmente y la impedancia sobrepasaba los 20 MΩ, la intensidad de corriente se incrementó hasta 400 nA y el tiempo se prolongó hasta 40 minutos.

Finalmente se retiraba la micropipeta lentamente y se lavaba la zona con suero fisiológico (NaCl 0,9%, Braun). Posteriormente, se repetía el mismo proceso de inyección en el otro hemisferio, inyectando en la misma subdivisión del VTA usando una nueva micropipeta. Al finalizar la cirugía, se suturaba la herida quirúrgica con seda de 2/0 (Lorca Marín USP) y los animales eran devueltos al animalario donde se les administraba el derivado opiáceo Buprenorfina (BUPREX; 0,075 mgr/Kg).

**Solución 1. BDA al 3% en acetato potásico 0,5M:** En 33,3 µl de acetato potásico 0,5M disolver 1 mg de BDA (10000 D, Invitrogen D 1956).

### 3.2.2 Inyección del vector viral Sindbis-pal-GFP

En 60 ratones se inyectó bilateralmente en las subdivisiones PBP, PN, rVTA y VTT del VTA una solución de pseudoviriones Sindbis-pal-GFP sin capacidad replicativa a baja titulación. Este vector viral RNA Sindbis-pal-GFP fue desarrollado y cedido a nuestro laboratorio por el grupo de Takeshi Kaneko, de la Universidad de Kyoto (Japón), y está diseñado para expresar una versión modificada de la proteína verde fluorescente (pal-GFP) fusionada con la señal de palmitoilación y direccionamiento a membrana GAP43 (Furuta y cols., 2001).

Las coordenadas estereotácticas empleadas para realizar las inyecciones de los vectores fueron -3,3 mm como coordenada anteroposterior,  $\pm 0,48$  mm como mediolateral y -4,25 mm dorsoventral. No se emplearon coordenadas diferentes para ubicar la inyección en las distintas subdivisiones del VTA dado que los pseudoviriones

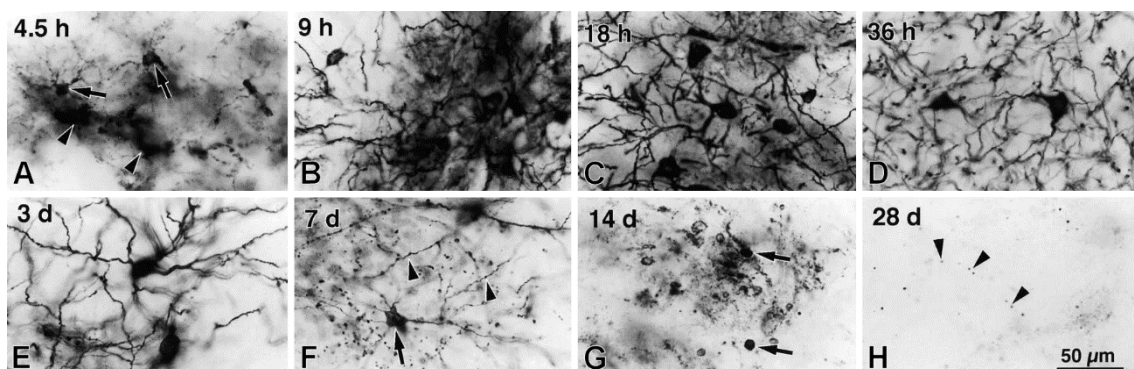
tienen capacidad de movilizarse en el espacio extracelular antes de penetrar en una célula, por lo que los depositábamos en una región céntrica del VTA con el fin de aumentar las posibilidades de que infectaran neuronas de las subdivisiones del VTA. Debido a esta movilidad incontrolada de los pseudoviriones, se tuvieron que eliminar varios experimentos en los que las neuronas infectadas estaban fuera del VTA.

Los pseudoviriones Sindbis-pal-GFP se diluyeron con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5% en PBS hasta una concentración de  $0,5 \times 10^7$  partículas virales /ml. Esta solución se cargaba mediante capilaridad en una micropipeta de vidrio (Ref.1B150F-4, World Precision Instruments, Inc, Sarasota, Florida, USA) con un diámetro externo de punta de 20  $\mu\text{m}$ , elaborada como se ha descrito anteriormente. La micropipeta cargada con la solución de pseudoviriones se colocaba en la torre del aparato de estereotaxia y se tomaban nuevamente las coordenadas de bregma; referencia a partir de la cual calculábamos las coordenadas de la inyección. Para la inyección de los pseudoviriones se empleó un Picospritzer III (General Valve Corporation, Estados Unidos) y pulsos de presión de 0,5-0,75 bar de 10 milisegundos, inyectando lentamente un volumen aproximado de 0,1  $\mu\text{l}$ . Después de realizar la inyección se esperaban 10 minutos antes de retirar la micropipeta con el fin de evitar arrastrar los pseudoviriones. Tras finalizar la inyección en un hemisferio, el proceso se repetía en el otro. Finalmente se lavaba la zona con suero fisiológico (NaCl 0,9%, Braun), se suturaba con seda de 2/0 (Lorca Marín USP) y se les administraba Buprenorfina (BUPREX; 0,075 mgr/Kg). Todo el material usado durante las cirugías con los pseudoviriones fueron cuidadosamente lavados con lejía para inactivarlos.

### **3.3 FIJACIÓN DE LOS CEREBROS POR PERFUSIÓN TRANSCARDÍACA**

En los casos de inyección de BDA, la fijación de los cerebros por perfusión transcardíaca se realizaba siete días después del día de la cirugía, ya que ese tiempo asegura que el trazador fuera transportado desde el soma hasta los campos terminales axonales y se produzca así un buen marcaje de todo el árbol axónico. Este tiempo entre la cirugía y la perfusión se reducía a un rango entre 48 y 56 horas en los casos de

inyección del pseudovirión Sindbis-pal-GFP. La estimación del intervalo de tiempo entre la inyección de los vectores virales y la perfusión de los cerebros más idóneo para obtener el mejor marcado posible de las neuronas individuales fue un aspecto metodológico importante que hubo que definir al inicio de este trabajo. Los datos existentes en la literatura sobre este tema se limitaban a la rata e indicaban que las células se visualizaban a partir de las 4,5 horas de la inyección; si bien, el marcaje no era suficientemente intenso hasta las 18 horas. Si se sacrificaba al animal a las 36 horas la intensidad de la tinción inmunorreactiva frente a la GFP era adecuada pero además de neuronas se marcaban células gliales y otras estructuras amorfas de difícil identificación. Si la perfusión se retrasaba entre las 48 y 72 horas, la inmunotinción frente a la GFP era suficientemente intensa y se confinaba a las neuronas (marcando soma, dendritas y axones). A partir de las 72 horas las neuronas degeneraban, alterándose la morfología de sus somas y dendritas (Furuta y cols., 2001; **Figura 10**).



**Figura 10. Inmunorreactividad frente a la GFP después de la inyección del vector viral Sindbis-pal-GFP.** **A:** transcurridas 4,5 horas desde la inyección se observan células gliales pequeñas inmunorreactivas (flechas) y depósitos amorfos inmunorreactivos (cabezas de flecha). **B:** a partir de las 9 horas desde la inyección aparecen neuronas inmunorreactivas. **C:** desde las 18 horas después de la inyección la inmunorreactividad frente a la GFP se confina a las neuronas y persiste así hasta las 36 horas (**D**) e incluso hasta las 72 horas (**E**). Después de 7 (**F**) a 14 (**G**) días desde la inyección, muchas neuronas muestran cambios degenerativos como dendritas con grumos (cabezas de flecha) y encogimiento de los somas celulares (flechas). **H:** Pasados 28 días desde la inyección una inmunorreactividad muy débil (cabezas de flecha) se puede apreciar en el lugar de la inyección. Figura tomada y modificada ligeramente de Furuta y cols. (2001).

Teniendo en cuenta los datos descritos por Furuta y cols. (2001) en la rata, expuestos anteriormente, y con el objetivo de determinar el mejor momento para realizar la perfusión después de la inyección del vector viral realizamos varias pruebas entre las 39 y las 70 h. Los resultados de experimentos piloto indicaron que un intervalo de 56 horas era adecuado para visualizar neuronas íntegras correctamente marcadas

(soma, dendritas y axón), sin tener apenas marcaje en astrocitos u otras estructuras amorfas. Sin embargo, este intervalo de tiempo entre la cirugía y la perfusión tuvo que reducirse a 48 horas debido a otro problema metodológico relacionado con la determinación de la naturaleza dopaminérgica de las neuronas infectadas, tal y como se tratará en el apartado 5.1.2.

La perfusión de los animales se realizó de la siguiente manera. En primer lugar se le administraba intraperitonealmente una sobredosis letal de anestésico [0,2 ml de una solución de pentobarbital sódico al 16% (Dolethal; **Solución 2**)]. Cuando estaba completamente dormido, se fijaba en posición de decúbito supino. Con rapidez, se le realizaba una amplia incisión transversal en el abdomen, se abría la cavidad peritoneal y se continuaba en sentido craneal, mediante la sección de las inserciones costales del diafragma. A continuación se levantaba la caja torácica, exponiendo el corazón. Se introducía una cánula en el ventrículo izquierdo y después se realizaba un corte limpio en la aurícula derecha.

Mediante una bomba de perfusión (Masterflex 77200-60, Cole-Parmer Instrument Company, Gelsenkirchen, Alemania) se procedía a lavar todo el sistema vascular con 15 ml de una solución de heparina al 0,1% en suero salino y después con unos 60-100 ml de una solución (**Solución 3**) de paraformaldehído (PAF) al 4% en tampón fosfato 0,1M (PB, pH 7,4).

Posteriormente el cerebro era extraído y postfijado en una solución de PAF al 4% durante 24 horas a una temperatura ( $T^a$ ) de 4 °C. Finalmente se introducía en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% en PB (**Solución 4**) durante 48 horas a 4 °C.

**Solución 2. Dolethal:** 3,3 ml de Dolethal diluidos en suero salino fisiológico (NaCl al 0,9%) hasta completar un volumen de 20 ml.

**Solución 3. Paraformaldehído (PAF) al 4% en PB:** En 1600 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> a 60 °C se disuelven 160 g de PAF. Añadir 2,2 ml de NaOH 5N (hasta que se aclare la solución), dejar enfriar la solución, enrasar hasta un volumen de 2000 ml y filtrar, obteniendo una concentración final de PAF del 8%. Mezclar 2000 ml de PAF al 8% con 2000 ml de PB 0,2M, pH 7,4 (**Solución 5**) en una proporción 1:1. Finalmente se ajusta el pH de la mezcla final hasta 7,4 con NaOH 5N.

**Solución 4. Sacarosa al 30%:** En 100 ml de tampón fosfato (PB 0,125M, pH 7,4) disolver 30 g de sacarosa.

**Solución 5. PB 0,2M, pH 7,4:** Mezclar 1000 ml de PB 0,4M, pH 7,4 (**Solución 6**) con 1000 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.

**Solución 6. PB 0,4M, pH 7,4:** Disolver 55,196 g de sodio dihidrogenofosfato monohidrato en 1000 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Disolver 227,136 g de di-sodio hidrógeno fosfato anhidro en 4000 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Añadir la solución de fosfato sódico monobásico a la de fosfato sódico dibásico, hasta obtener un pH de 7,4.

### 3.4 PROCESAMIENTO DE LOS CEREBROS

#### 3.4.1 Cerebros con microdepósitos de BDA

##### 3.4.1.1 Corte del tejido cerebral

Cada cerebro se cortó mediante un microtomo de congelación (Leica SM 2400) en el plano sagital, comenzando a cortar desde el extremo más lateral del hemisferio izquierdo hasta el límite lateral del hemisferio derecho, obteniéndose cortes de 70 µm de espesor seriados recogidos individualmente en cajas de 24 pocillos (Ref. 3820-024, IwakiGlass Co, Funahashi, Japón), con tampón fosfato salino 0,1M, pH 7,4 (PBS; **Solución 7**).

##### 3.4.1.2 Inactivación de la peroxidasa endógena e incubación con los complejos ABC

Los cortes se lavaban con PBS realizando 3 lavados de 10 minutos de duración cada uno. Seguidamente se realizaba la inactivación de la peroxidasa endógena mediante una solución (**Solución 8**) compuesta por 99% de etanol al 50% y 1% de peróxido de hidrógeno al 30%, sin agitación durante 40 minutos. A continuación se realizaban otros 3 lavados con PBS de 10 minutos de duración cada uno.

La solución de los complejos ABC (ABC Elite; PK 6100; Vector, California, Estados Unidos) se preparaba con antelación para que permaneciera entre media y una hora en reposo



antes de usarla. Finalmente, se dejaban los cortes una noche, inmersos en la solución de ABC (**Solución 9**) en agitación y a 4 °C.

**Solución 7. Tampón fosfato salino 0,1M, pH 7,4:** En 3750 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> añadir 1250 ml de PB 0,4M a pH 7,4, disolver 45 g de NaCl y ajustar el pH a 7,4.

**Solución 8. Solución de inactivación de peroxidasa endógena:** Añadir 500 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% a 49500 µl de etanol al 50%.

**Solución 9. Complejo Avidina-Biotina, solución de ABC Elite:** Para un volumen de 12 ml, que es lo necesario para 24 pocillos, se emplean 9.388 µl de PBS 0,1M, pH 7,4, 2.400 µl de PBS Tritón 1%, 105,75 µl de "A" y 105,75 µl de "B".

#### **3.4.1.3 Revelado del trazador con níquel-diaminobenzidina**

Tras la incubación de los cortes en la solución de los complejos ABC se lavaron dos veces en PBS pH 7,4 y una vez en tampón Tris-HCl 0,05M, pH 7,6 (**Solución 10**). Posteriormente los cortes se incubaron en una solución que contenía 0,025% de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorídrica (DAB, Sigma, St Louis, MO), 0,3% de sulfato amónico de níquel, 0,005% de cloruro de cobalto y un 0,008% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% en tampón Tris-HCl 0,05M pH 7,6 (**Solución 11**) en hielo y durante un tiempo aproximado de 5-10 minutos. La reacción se completó mediante un lavado en tampón Tris-HCl 0,05M pH 7,6 seguido de dos lavados en PBS de 10 minutos cada uno.

**Solución 10. Tampón de Tris-HCl, 0,05M, pH 7,6:** En 1000 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> se disuelven 6,06 g de Trizma. Ajustar el pH con HCl hasta 7,6.

**Solución 11. Solución de revelado con níquel-diaminobenzidina:** En 50 ml de Tris-HCl 0,05M, pH 7,6 se disuelven 150 mg de sulfato amónico de níquel, 15 mg de cloruro de cobalto y 10 mg de DAB (en oscuridad, es sensible a la luz). Se filtra y se añaden 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.

#### **3.4.1.4 Contratinción con tionina**

Una vez revelado el trazador los cortes se montaron sobre portaobjetos y se realizó una tinción con tionina (Panreac) con el fin de visualizar las distintas estructuras neurales y poder precisar la ubicación de las inyecciones y de los campos axonales terminales.

Para realizar esta tinción, en primer lugar los cortes se lavaban durante unos 5 segundos en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, dos veces. A continuación se introducían los cortes en tiónina diluida 1:10 durante 10 segundos. Después se realizaba otro lavado en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se procedía a la deshidratación de los cortes mediante su inmersión en una serie de soluciones de etanol a una concentración creciente (70°, 80°, 96°, 100°, 100°) durante 1 minuto en cada concentración de etanol. Se dejaban los portaobjetos en Xilol (30-40 minutos) y finalmente se cubrían con DePeX (Serva).

### **3.4.2 Cerebros con vectores Sindbis-pal-GFP**

#### ***3.4.2.1 Corte del tejido cerebral***

Cada cerebro se cortó en el plano sagital desde el extremo más lateral del hemisferio izquierdo hasta el borde lateral del hemisferio derecho mediante un microtomo de congelación (Leica SM 2400), obteniéndose cortes de 50 µm de espesor ordenados cuidadosamente para no perder la secuencia mediolateral. Los cortes fueron recogidos individualmente en cajas de 24 pocillos (Ref. 3820-024, IwakiGlass Co, Funahashi, Japón), con tampón fosfato salino 0,1M, pH 7,4 (PBS; **Solución 7**).

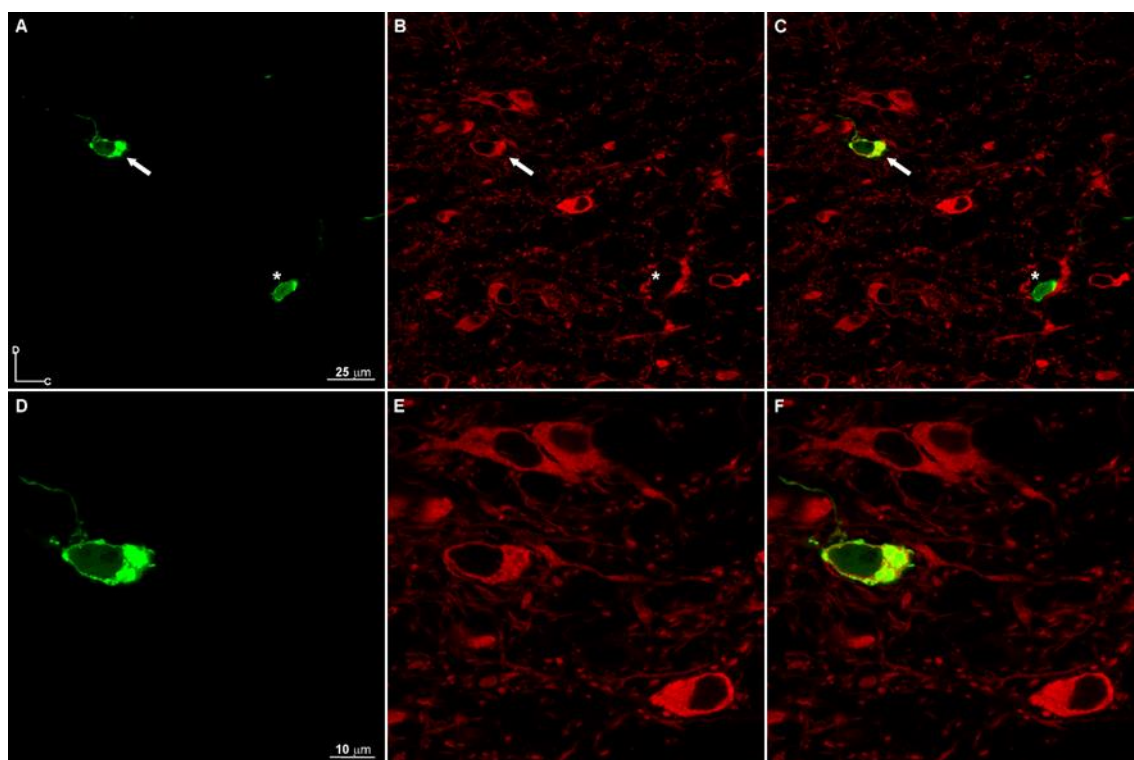
#### ***3.4.2.2 Inmunofluorescencia para tirosina hidroxilasa (TH)***

Las secciones en las que se localizaba la inyección de los pseudoviriones se montaron en un portaobjetos humedecidas con PB 0,1M y se observaron en un microscopio de fluorescencia (Eclipse E80i, Nikon) y un filtro adecuado (excitación, 450-490 nm; emisión, 515-565 nm) para visualizar las neuronas del VTA que habían sido infectadas por el pseudovirión y por lo tanto expresaban pal-GFP [neuronas pal-GFP positivas (+)].

En las secciones donde se visualizaron neuronas pal-GFP + situadas dentro del VTA se realizó una tinción de inmunofluorescencia para TH con el fin de determinar su naturaleza dopaminérgica. El protocolo de esta tinción fue el siguiente: las secciones se dejaron incubar en agitación una noche a 4 °C con una solución de PBS que contenía el anticuerpo primario monoclonal ratón- anti-TH (1:1000) (ImmunoStar), 0,1% Tritón X-

100 y 2% de suero normal de cabra (NGS). Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno en PBS y a continuación las secciones fueron incubadas en agitación durante dos horas a Tª ambiente con un anticuerpo secundario de cabra frente a ratón conjugado con Alexa Fluor 568 [*goat anti-Mouse-Alexa Fluor 568* (Molecular Probes; 1:200)] en PBS que contenía 0,1% de Tritón X-100 y 2% de NGS. Finalmente los cortes se lavaron una vez en PBS y dos lavados en PB 0,1M.

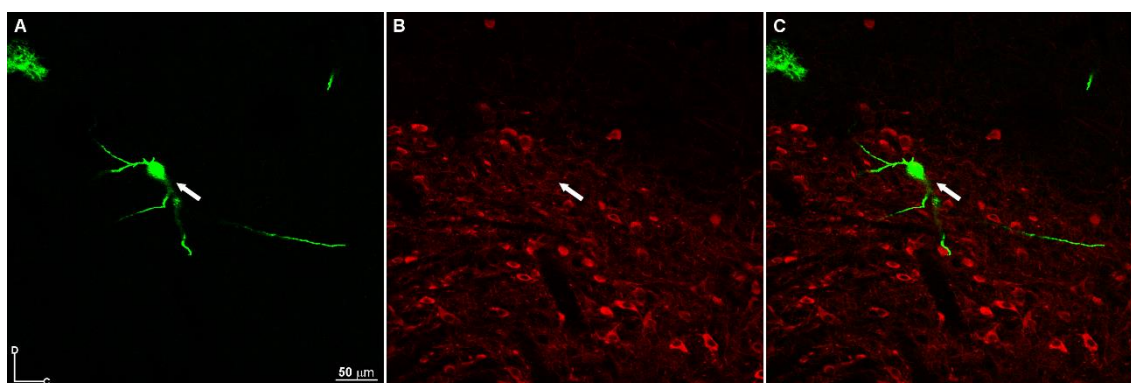
En el microscopio de fluorescencia, empleando los filtros adecuados para GFP y Alexa Fluor 568 (excitación, 579 nm; emisión, >603 nm), determinamos la localización de las neuronas infectadas con el pseudovirión con respecto a las subdivisiones de VTA identificadas mediante la inmunofluorescencia frente a la TH (véase el apartado 3.6.3 en Análisis del Material). A continuación, todas las neuronas que expresaban GFP ubicadas en alguna subdivisión del VTA fueron examinadas con el microscopio confocal (Espectral Leica TCS SP5; 10% argón láser y 52% DPSS 561 nm láser) con los objetivos de 10X y 63X para determinar si presentaban inmunorreactividad para la TH (**Figura 11**).



**Figura 11. Inmunorreactividad frente a la TH de los somas neuronales de VTA infectados por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP.** A-C: microfotografías a 10X de una sección sagital del mesencéfalo de ratón, tomadas con el microscopio confocal, mostrando dos neuronas (flecha y asterisco) localizadas en VTA. **A:** las neuronas expresan pal-GFP (verde) tras ser infectadas por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP. **B:** inmunotinción frente a la TH en la que se puede observar que una neurona es TH+ (roja), señalada por la flecha, y la otra, señalada por el asterisco, es TH- (no se visualiza roja). **C:** fusión de la imagen A y B en la que se muestran las dos neuronas infectadas por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP observándose que la neurona señalada por la flecha es dopaminérgica y la neurona señalada por el asterisco no lo es. **D-F:** microfotografías a 63X de la neurona señalada por la flecha en A-C. **D:** la neurona expresa pal-GFP (verde) tras ser infectadas por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP. **E:** inmunotinción frente a la TH en la que se puede observar que la neurona es TH+ (roja). **F:** fusión de la imagen D y E en la que se observa que la neurona infectada por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP (verde) es dopaminérgica (roja). La barra de calibración de A es válida para B y C y la de D lo es para E y F.

Al analizar en el microscopio confocal la expresión de TH en las neuronas infectadas del VTA, resultó extraño que en muchas de ellas la inmunofluorescencia resultara negativa, sugiriendo que o bien carecieran de esta enzima y por lo tanto no fueran dopaminérgicas, o que poseyeran esta enzima pero no se pudiera visualizar. Esta última idea resultaba bastante posible ya que en la mayoría de los casos las neuronas infectadas estaban ubicadas entre una multitud de neuronas TH+ (**Figura 12**). Dado que la vida media de la TH es de 30 horas (Tank y cols., 1986) pensamos que si se esperaba 56 horas entre la inyección y la perfusión, la enzima TH existente antes de la infección por el virión ya se habría metabolizado y, además, al producirse la infección por el pseudovirión se inhibe la síntesis de proteínas por parte del huésped (Bredenbeer, 1993)

por lo que no se pueden sintetizar nueva TH. Por este motivo acortamos el tiempo de espera a 48 horas para realizar la perfusión transcardíaca, para poder demostrar la presencia de la TH en las neuronas dopaminérgicas, pero asegurando al mismo tiempo un buen marcaje de toda la neurona, tanto del soma como de sus prolongaciones dendríticas y axónica.



**Figura 12. Neurona de VTA infectada por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP que no expresa la TH y está localizada entre numerosas neuronas dopaminérgicas (TH+) del VTA.** Las imágenes son microfotografías a 10X de una sección sagital del mesencéfalo de ratón, tomadas con el microscopio confocal. **A:** neurona (flecha) que expresa pal-GFP (verde) tras ser infectadas por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP. **B:** inmunotinción frente a la TH de la misma sección en la que se puede observar que la neurona es TH negativa (TH-) a pesar de estar ubicada en una zona con abundantes neuronas TH+ (rojas). **C:** fusión de las imágenes A y B en la que se muestra que la neurona infectada por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP es TH-. La barra de calibración de A es válida para B y C.

### 3.4.2.3 Inmunoperoxidasa para GFP

En aquellos casos en los que había alguna neurona infectada con el pseudovirión ubicada en el VTA se procedió a revelar la GFP en todos los cortes del cerebro del ratón. El procedimiento fue el siguiente: todos los cortes se incubaron en agitación durante 20 minutos a Tª ambiente en la solución de inactivación de la peroxidasa endógena compuesta de 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en 98 ml de PB 0,1M. Después se realizaban dos lavados de 10 minutos en PB 0,1 M y un tercero en PB 0,1M con Tritón X-100 al 2%. Posteriormente, las secciones se incubaban toda la noche a Tª ambiente, en agitación, en una solución compuesta de un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-GFP (Exbio; 1:500), Tritón X-100 al 2%, NGS al 3% y BSA al 1% en PB 0,1 M.

Al día siguiente, después de varios lavados con PB 0,1M, las secciones fueron incubadas durante dos horas a Tª ambiente, en agitación, con una solución compuesta de un anticuerpo secundario biotinilado, de cabra anti-conejo (Sigma; 1:100), Tritón X-

100 al 2%, NGS al 3% y BSA al 1% en PB 0,1M. A continuación, las secciones se lavaban tres veces con PB durante 30 minutos y se dejaban en incubación, bajo agitación, toda la noche a 4 °C en una solución compuesta de ABC Elite (Vector, PK 6100) diluido 1:100 en PB 0,1M más Tritón X-100 al 2%. Después de varios lavados con PB se revelaba la unión de la peroxidasa mediante níquel-DAB por el método de la glucosa oxidasa (Shu y cols., 1988). Para ello se preparaba una solución de 50 ml de tampón acetato salino 0,2M, pH 6 a la que se le añadía 1,21 gr de níquel sulfato, 0,2 gr de D-glucosa y 0,02 gr de NH<sub>4</sub>Cl. A continuación, se preparaba otra solución mezclando en agitación 50 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y 0,02 gr de DAB. Ambas soluciones se mezclaban en la campana de extracción, protegidas de la luz, y se filtraba con papel de filtro. Después se añadían 0,003 gr de glucosa oxidasa y se dejaba en agitación dentro de la campana hasta que estuviera disuelta y fuera homogénea. Inmediatamente después se revelaban los cortes, incubándolos unos minutos hasta que se oscurecieran. Finalmente se realizaban dos lavados en tampón acetato salino 0,1M de 5 minutos cada uno y dos lavados en PB 0,1M de 5 minutos cada uno.

#### **3.4.2.4 Contratinción con tionina**

Una vez revelada mediante inmunohistoquímica la GFP se montaron los cortes en portaobjetos gelatinizados y se realizó una tinción con tionina (Panreac; pm=263,75) (ver apartado 3.4.1.4.) con el fin de visualizar la citoarquitectura e identificar las distintas estructuras neurales.

### **3.5 TINCIONES PARA LA DELIMITACIÓN NEUROQUÍMICA DE LAS SUBDIVISIONES DEL VTA EN RATONES**

Tal y como se ha comentado previamente, en este estudio se realizaron inyecciones de BDA o del vector Sindbis-pal-GFP con el fin de marcar poblaciones pequeñas de neuronas y neuronas individuales en distintas subdivisiones del VTA. Con el objetivo de delimitar lo más exactamente posible las subdivisiones de esta región mesencefálica en el plano sagital, empleamos tres ratones a los que no se les había realizado ninguna inyección para realizar tinciones que nos permitiesen delimitar estos

territorios en el plano sagital, basándonos en los datos existentes en la literatura (Phillipson, 1979a; Halliday y Törk, 1986; McRitchie y cols., 1996; Ikemoto, 2007; Franklin y Paxinos, 2007; Fu y cols., 2012). En concreto usamos el encéfalo completo de dos ratones para las tinciones de la TH y de Nissl, cada tinción realizada en un cerebro. En el encéfalo del tercer ratón se realizaron las tinciones de Nissl y acetilcolinesterasa (AChE) en secciones alternas. A continuación, detallaremos los protocolos usados para realizar estas tinciones.

### **3.5.1 Inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa**

El protocolo empleado para desarrollar la tinción inmunohistoquímica frente a la TH, utilizada para poder definir los límites de las distintas subdivisiones del VTA de acuerdo con la descripción de Ikemoto (2007), fue esencialmente el mismo que el descrito anteriormente (apartado 3.4.2.2.) excepto que el anticuerpo secundario era una IgG biotinilada de caballo anti-ratón, diluido a 1:250 (Vector). Los cortes se deshidrataron en cristalizadores (etanol 70° durante 3 minutos, 3 minutos en etanol 80°, 3 minutos en etanol 96°, 3 minutos en etanol 100°, 3 minutos en etanol 100° y una hora en 6 xiloles), y se cubrieron los portas con DPX.

### **3.5.2 Tinción de Nissl**

La tinción de Nissl también ha sido ampliamente usada para diferenciar subdivisiones del VTA en varias especies incluidos los roedores (Phillipson, 1979a; Halliday y Törk, 1986; Franklin y Paxinos, 2007). Para realizar esta tinción, las secciones sagitales del encéfalo de ratón se montaron en portas gelatinizados en PB 0,1M, pH 7,4 diluido 1/3. Los portaobjetos se colocan en cestillas y se dejan secar durante 24 horas. Las cestillas se introducen en cristalizadores con etanol 70° durante la noche anterior. El día de la tinción, en primer lugar, preparamos el violeta de cresilo 2% (Merck), compuesto por 2,5 ml ácido acético al 10% y 500 ml violeta de cresilo al 0,1%, en agitación en la estufa. Después se enciende el baño a 45 °C con la tapa abierta y se preparan nueve cristalizadores:

- Uno con violeta de cresilo (introducirlo en el baño de 45 °C).

- Uno con etanol 70°
- Dos con etanol 96°
- Uno con etanol 100°
- Uno con diferenciador limpio
- Tres con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>

A continuación se prepara un vaso de precipitados con cloroformo 100% y otro con diferenciador sucio. Para proceder a la tinción se saca la cestilla del cristizador con etanol 70° y se hace un lavado rápido en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Seguidamente se introduce en el violeta de cresilo durante cinco minutos en agitación en el baño a 45 °C con la tapa abierta. Se realizan dos lavados en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> de 30 segundos cada uno, un lavado en etanol 70° durante 30 segundos y un lavado en etanol 96° de 30 segundos. Después se introduce en cloroformo 100% 10 minutos en agitación. Se lava en etanol 96° durante 30 segundos y se introduce en el diferenciador sucio en agitación hasta que la sustancia blanca se torne blanquecina. Se realiza un lavado en diferenciador limpio (20 ml ácido acético/ 1 L etanol 96°) y un lavado en etanol 100° de 30 segundos. Finalmente se deshidrata en xiloles durante 1 hora y se cubren los portaobjetos con DPX.

### 3.5.3 Tinción de acetilcolinesterasa (AChE)

La tinción de AChE permite diferenciar subdivisiones del VTA en ratas (Paxinos y cols., 1999; Paxinos y Watson, 2007), ratones (Franklin y Paxinos, 2007) y cerdos (Ostergaard y cols., 1992). Para visualizar la actividad de esta enzima se ha empleado un protocolo modificado de Karnovsky y Roots (1964) (Tripathi y cols., 2010). Las secciones sagitales del encéfalo de ratón se colocaban en cajas multipocillo a T<sup>a</sup> ambiente y se realizaba un lavado en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> en agitación durante 10 minutos. Después se incubaban las secciones con la solución de incubación (**Solución 12**) en la oscuridad y en agitación a T<sup>a</sup> ambiente durante 1 hora o 1 hora y media. A continuación las secciones se metían en la solución del revelado (**Solución 13**) durante unos 3 minutos, en agitación, hasta observar el color deseado. Después se realizaban varios lavados con agua H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, en agitación, hasta que desaparecía el color amarillo. Finalmente se realizaban tres lavados en PB 0,1M pH 7,4, en agitación, de 10 minutos cada uno. A continuación se montaban los



cortes en los portas gelatinizados en PB 0,1M pH 7,4 diluido 1/3. Se colocaban los portaobjetos en cestillas y se dejaban secar 24 horas. Finalmente se deshidratan en cristalizadores (etanol 70° durante 3 minutos, 3 minutos en etanol 80°, 3 minutos en etanol 96°, 3 minutos en etanol 100°, 3 minutos en etanol 100° y una hora en 6 xiloles), y se cubren los portaobjetos con DPX.

**Solución 12. Solución de incubación:** se prepara, añadiendo en este orden, 100 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, 23 mg etopropazina (Sigma; pm=348,9) que es un inhibidor de esterasas inespecíficas, 100 mg de acetilcolina iodada (Sigma; pm=289,2), 75 mg de glicina (Sigma; pm=75,07), 50 mg de sulfato cúprico (Panreac; pm=249,68) y 410 mg de acetato sódico (Panreac; pm=82,03). Ajustar a pH 5 con ácido glacial lentamente. Se prepara y se guarda en una botella protegida de la luz.

**Solución 13. Solución de revelado:** solución de ferrocianuro potásico (Sigma; pm=329,26) al 10% (1 g/10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). Se prepara inmediatamente antes del revelado de los cortes.

## 3.6 ANÁLISIS DEL MATERIAL

### 3.6.1 Delimitación neuroquímica de las subdivisiones del VTA

Tal y como se ha comentado en la Introducción (apartado 1.1.2), el VTA de roedores está parcelada en varias subdivisiones que varían según los autores (véase la **Tabla 1** sobre las subdivisiones de VTA). En nuestro estudio nos hemos centrado en 4 subdivisiones del VTA, el PBP, PN, rVTA y VTT, y para delimitarlas se han empleado secciones sagitales del encéfalo de ratón teñidas con inmunohistoquímica para la TH y otras teñidas para Nissl y AChE. El VTA es una zona rica en neuronas dopaminérgicas (TH+), y sus subdivisiones presentan diferentes características inmunohistoquímicas para la TH que permite diferenciarlas, tal y como se detalla en el apartado 4.1 de los Resultados. Para establecer los límites precisos de cada subdivisión nos hemos basado fundamentalmente en el atlas de Franklin y Paxinos (2007) y en el artículo de Ikemoto de 2007. El atlas de Franklin y Paxinos (2007) proporciona además del dibujo de cada

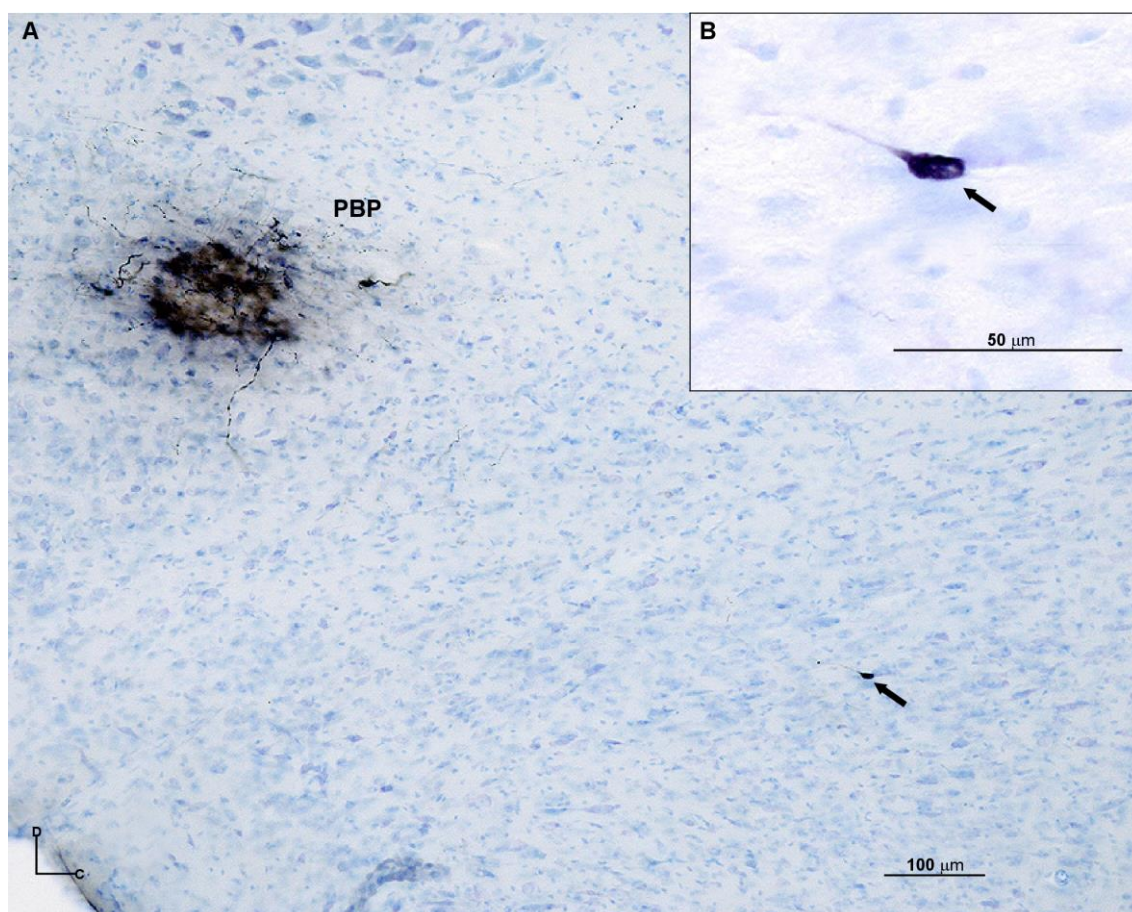
sección sagital con las coordenadas estereotácticas de cada estructura, las secciones sagitales histológicas con las tinciones de Nissl y AChE, de forma alternante.

### **3.6.2 Localización de los microdepósitos de BDA y de los campos terminales**

Las secciones sagitales teñidas con tiónina que contenían el depósito de BDA fueron observadas con microscopio óptico con objetivos de 4X y 10X para establecer en qué subdivisión del VTA se localizaba este depósito, teniendo en cuenta las delimitaciones de las subdivisiones que previamente habíamos definido, así como para determinar su extensión.

Puesto que este estudio planteaba analizar las proyecciones eferentes de las subdivisiones del VTA, sólo se incluyeron en el análisis los depósitos de BDA confinados en una sola subdivisión, y todos los demás casos en los que la inyección se extendía en más de una subdivisión fueron descartados. Las secciones que contenían los depósitos de BDA y las secciones adyacentes fueron detenidamente examinadas para detectar posibles células marcadas retrógradamente. En los casos incluidos en este estudio solamente se encontraron neuronas localizadas alrededor de los depósitos del trazador. La mayoría de estas neuronas estaban muy cerca del depósito de BDA, estando localizadas en la misma subdivisión del VTA que el depósito del trazador y mostrando un intenso marcaje del cuerpo celular y las dendritas. Sin embargo las neuronas situadas más lejos de los depósitos de BDA mostraron un marcaje muy débil de su soma y de sus dendritas, debido probablemente a la insuficiente captación del trazador como consecuencia de la pequeña cantidad de BDA que se inyectó en cada depósito, y por eso se consideró que sus axones no podían originar campos terminales visibles con ese marcaje de BDA (**Figura 13**).

Los campos terminales fueron examinados detenidamente bajo microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i) con los objetivos de 20X y 40X y se tomaron microfotografías utilizando una cámara digital (DXM1200F, Nikon) acoplada al microscopio óptico (Eclipse E80i, Nikon). Las figuras fueron ajustadas en contraste y brillo con el programa Adobe Photoshop CS4 (versión 11.0, Adobe).

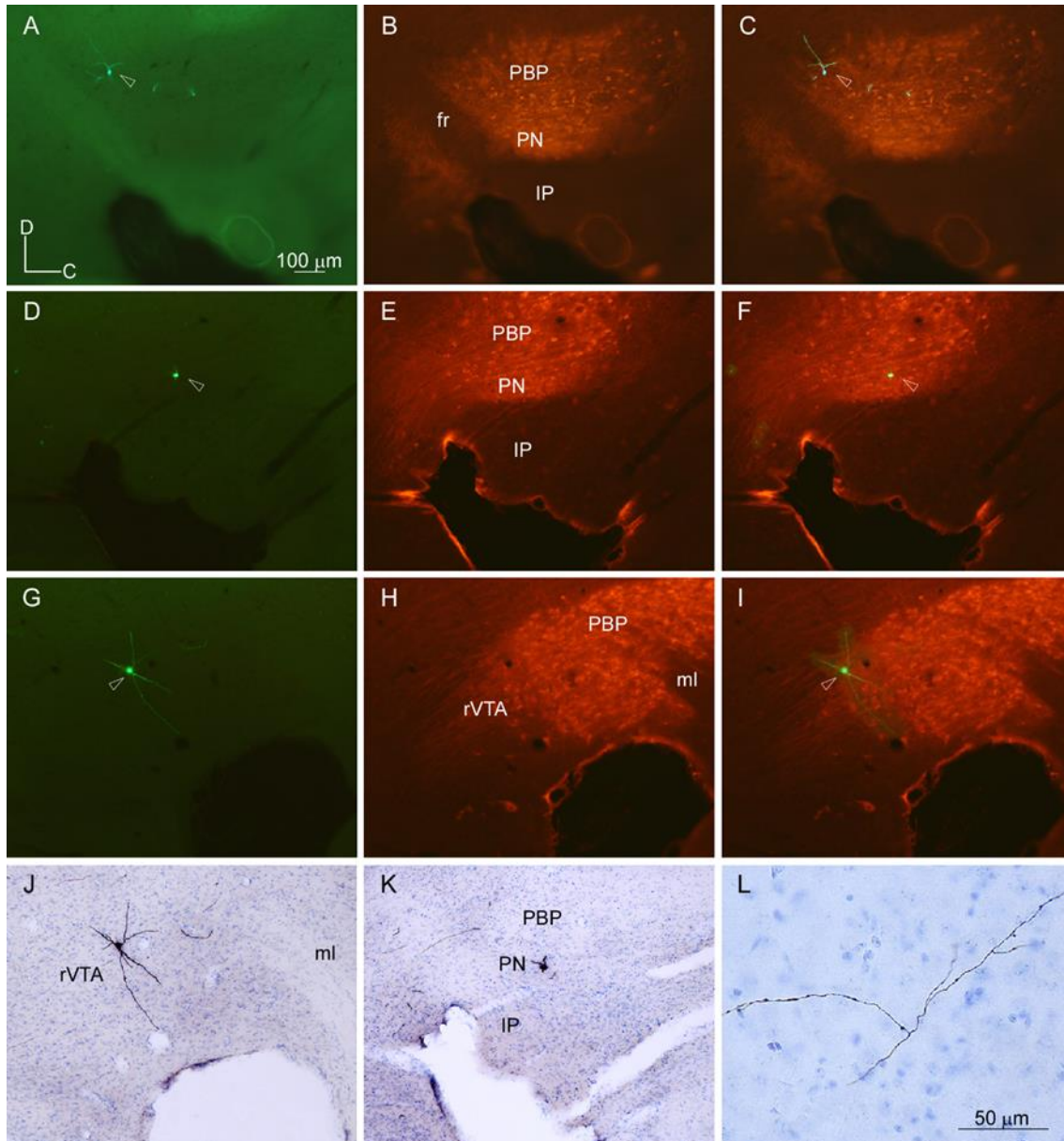


**Figura 13. Depósito de BDA localizado en PBP.** A: microfotografía de un depósito de BDA localizado en PBP rodeado por varias neuronas marcadas retrógradamente. Obsérvese que la neurona situada lejos del depósito principal de BDA (flecha) está débilmente teñida y sus dendritas apenas son visibles. B: microfotografía a mayor aumento de la neurona señalada por la flecha en A. Véase la Lista de Abreviaturas

### 3.6.3 Localización de las neuronas que expresan pal-GFP, determinación de su naturaleza dopaminérgica y trazado de sus axones

La determinación de la localización precisa dentro del VTA de cada una de las neuronas que expresan la GFP se realizó siguiendo dos pasos sucesivos: en primer lugar, tras realizar la tinción de inmunofluorescencia frente a la TH (que, como se explicó en el apartado 3.4.2.2. se veía en color rojo) en el mismo corte en el que se ubicaba el soma neuronal visualizado de color verde brillante por su contenido en GFP. De esta manera, en el microscopio de fluorescencia se observaba la localización del soma (verde) con respecto a la distribución de neuronas TH+ (rojo) (**Figura 14 A-I**), lo que permitía determinar la subdivisión en la que se localizaba la neurona marcada con GFP. En segundo lugar, tras revelar la inmunotinción frente a la GFP con Ni-DAB y hacer la

contratinción con tionina (explicadas en los apartados 3.4.2.3. y 3.4.2.4.) se corroboraba la ubicación del soma neuronal observando la citoarquitectura de las subdivisiones del VTA (**Figura 14 J-L**).



**Figura 14. Localización de los somas neuronales infectados por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP en las subdivisiones del VTA, delimitadas por su inmunorreactividad frente a TH.** A-C: microfotografías de una sección del mesencéfalo de ratón, tomadas con el microscopio de fluorescencia, mostrando una neurona marcada con GFP (A), la inmunotinción frente a TH (B) y la fusión de A y B (C), observándose que la neurona se sitúa en la región dorsal de PBP, caudal al fascículo retrorreflejo (fr). D-F: microfotografías de otra sección sagital de un ratón diferente, tomadas también con el microscopio de fluorescencia, mostrando una neurona marcada con GFP (D), la inmunotinción frente a TH (E) y la fusión de ambas imágenes (F) que muestra la localización de la neurona en PN. G-J: microfotografías de otra sección sagital, tomadas con el microscopio de fluorescencia, mostrando una neurona infectada por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP (G), la inmunotinción frente a TH (H) y la fusión de G y H (J), mostrando la localización de la neurona en rVTA. J: sección mostrada en G-J con inmunoperoxidasa para el revelado de la GFP y contratinción con tionina para mostrar la citoarquitectura. K, L: microfotografías tomadas con microscopio óptico que muestran el soma (K) y un fragmento del axón (L) de la neurona mostrada en D y F, después del revelado de la GFP con inmunoperoxidasa y contratinción con tionina para revelar su citoarquitectura. La barra de escala en A es válida para B-K. Véase la Lista de Abreviaturas

Las reconstrucciones de neuronas únicas realizadas en este trabajo proceden de 16 ratones en los que, bien en uno de sus hemisferios o en ambos, se obtuvieron neuronas infectadas ubicadas dentro del VTA y el material obtenido tras su procesamiento en el laboratorio fue óptimo para su análisis. En la **Tabla 4** se especifica el número de neuronas marcadas en cada hemisferio de los 16 ratones. En 15 hemisferios se obtuvieron entre 1-3 neuronas infectadas. En estos casos los axones se pudieron individualizar y reconstruir fácilmente a través de cada una de las secciones sagitales. En los otros cuatro hemisferios fueron infectadas 4, 5, 6 y 15 neuronas respectivamente, lo que dificultaba la individualización de los axones, pero a pesar de ello pudimos reconstruir con seguridad 10 neuronas. Aquellas neuronas cuyos axones se cruzaban o solapaban y no se podían separar con claridad se excluyeron del estudio.

**Tabla 4.** Neuronas del VTA infectadas por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP y reconstruidas en cada animal

RATÓN	HEMISFERIO	NÚMERO DE NEURONAS DEL VTA INFECTADAS	NÚMERO DE NEURONAS DEL VTA RECONSTRUIDAS
1	Derecho	2	2
2	Derecho	3	2
3	Izquierdo	3	1
4	Derecho	1	1
	Izquierdo	1	1
5	Izquierdo	1	1
6	Izquierdo	2	1
7	Derecho	2	1
	Izquierdo	2	1
8	Derecho	5	2
9	Derecho	15	3
10	Izquierdo	1	1
11	Derecho	6	3
12	Derecho	2	2
13	Derecho	4	2
	Izquierdo	3	1
14	Izquierdo	3	3
15	Izquierdo	1	1
16	Izquierdo	2	1

Los somas celulares y la trayectoria axonal completa de las neuronas del VTA que fueron infectadas por el pseudovirión y por tanto expresaban pal-GFP fueron dibujadas y situadas en las estructuras neurales donde se localizaban en cada sección sagital utilizando un microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i) con objetivos de 20X y 40X y una cámara lucida. Posteriormente los dibujos fueron digitalizados mediante un escáner y

los axones fueron dibujados de nuevo utilizando la aplicación CANVAS X (ACD Systems International). Para la ilustración de las neuronas únicas se han usado imágenes de cortes sagitales del encéfalo de ratón teñidas para calbindina o AChE, sobre las que se superpusieron las reconstrucciones de las neuronas. La tinción para calbindina se realizó siguiendo el mismo protocolo inmunohistoquímico descrito para la TH pero usando como anticuerpo primario el anti-calbindina hecho en ratón (1:2500; Sigma) y una IgG biotinilada de caballo anti-ratón, diluida a 1:250 (Vector). La tinción de AChE se usó en los axones con proyección abundante al prosencéfalo basal porque delimita muy bien estructuras como el tubérculo olfatorio.

Las microfotografías de los campos terminales de la **Figura 23 B** y **Figura 25 C** son imágenes fusionadas de numerosas fotografías tomadas en diferentes planos de enfoque utilizando la aplicación Image J (Rasband, 1997-2012).

### **3.6.4 Estimación de la longitud de axón presente en los campos terminales proporcionados por neuronas individuales**

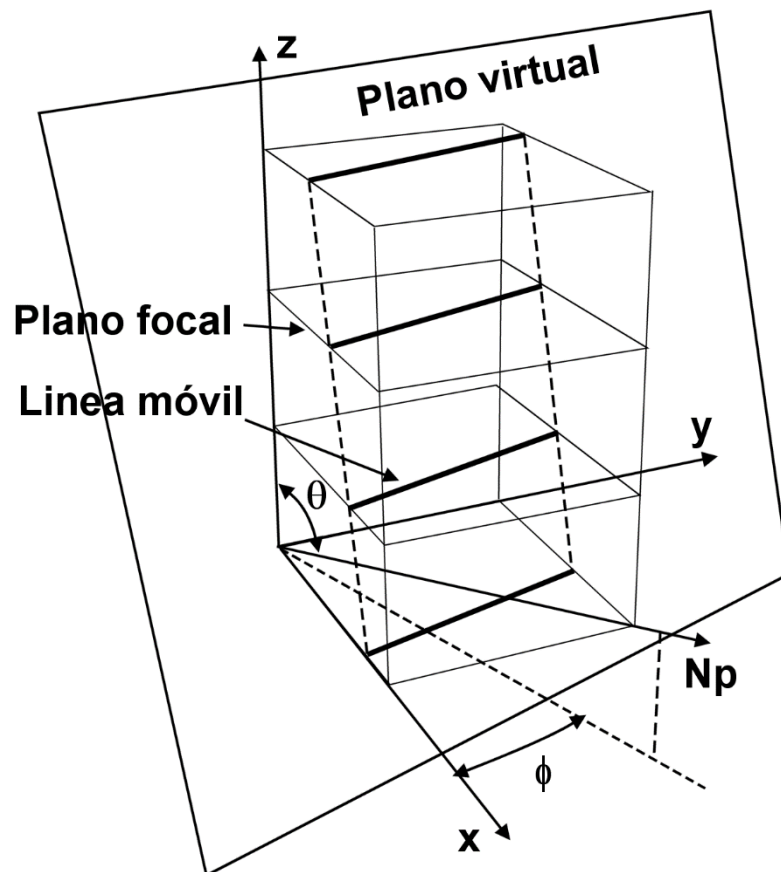
Uno de los objetivos propuestos en este estudio fue el de aportar datos cuantitativos de la cantidad de inervación proporcionada por una misma neurona en diversas estructuras a las que inerva. Con este fin, en este trabajo hemos estimado la longitud de axón (L) presente en los campos terminales proporcionados en las principales estructuras inervadas por neuronas individuales del VTA infectadas por el vector Sindbis-pal-GFP.

Para estimar la longitud de axón de los campos terminales empleamos el método de muestreo de los planos virtuales isotrópicos (Larsen y cols., 1998), método descrito anteriormente en detalle por otros autores (García-Amado y Prensa, 2013; García-Amado, 2014). Esta técnica puede ser aplicada a secciones orientadas en cualquier plano, ya que los planos virtuales se disponen aleatoriamente dentro del espesor de la sección mediante el uso del programa informático VIS, el módulo newCAST (Visiopharm Integrator System, Hørsholm, Denmark, v. 3.6.2.0), instalado en un ordenador conectado al microscopio. Así se evita el posible sesgo derivado de estructuras que



posean una orientación preferente, como puede ser el caso de los axones de las neuronas del VTA visualizados en cortes sagitales.

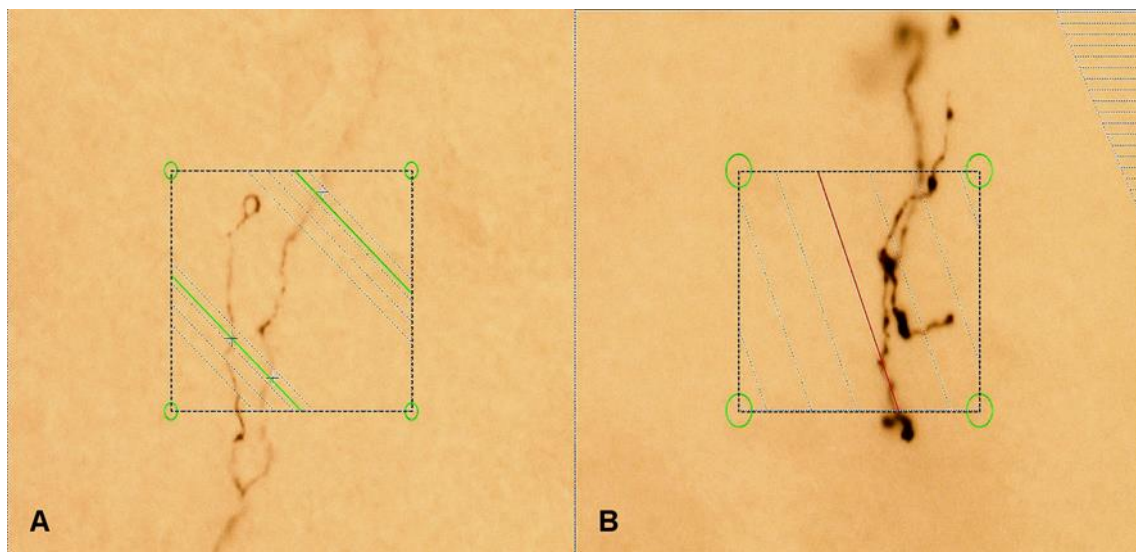
Este análisis estereológico se realizó mediante un microscopio BX61 (Olympus, Tokyo, Japón) equipado con un *microcator* Heidenhain MT 12 (resolución de 0,5  $\mu\text{m}$ ), una platina motorizada en X-Y-Z (ProScan II, Prior Scientific, Cambridge, Reino Unido) y una cámara digital DP-71 (Olympus) conectada a un ordenador con dos monitores provisto del programa de estereología newCAST de VIS. Este programa genera los planos virtuales en 3D, paralelos, equidistantes, orientados isotrópicamente, que intersecaban sucesivamente con planos focales en 2D dentro de una caja virtual de muestreo, orientada arbitrariamente en el espesor de un corte (**Figura 15**).



**Figura 15. Planos virtuales isotrópicos.** La figura muestra un plano virtual en 3D que es seccionado por sucesivos planos focales en 2D dentro de una caja de muestreo. El plano virtual existe en 3D y se representa en 2D como un plano focal, indicándose la intersección entre el plano virtual y el focal como una línea. Cuando se enfoca a lo largo del eje Z el plano virtual es dinámicamente visualizado como una línea en movimiento. Figura tomada de Larsen y cols. (1998).



El plano virtual es visualizado como una línea que se mueve por la pantalla mientras el plano focal se mueve a través del espesor de la sección en el eje Z, es decir que la línea en movimiento indica la intersección entre el plano focal y el plano virtual a través del espesor del corte. Se cuenta el número de intersecciones de las fibras nerviosas con los planos virtuales. Se considera una intersección (Q) cuando la línea que representaba la intersección entre el plano virtual y el focal aparece en color verde y corta una fibra enfocada. Si la línea que representa la intersección entre el plano virtual y el focal aparecía en color rojo (indicando que está en la zona de guarda superior) y se mantiene en contacto con la fibra enfocada no se considera una intersección, aunque después apareciera de color verde, cortando a la fibra enfocada. Si la fibra corta a la línea roja en la zona de guarda superior, deja el plano focal cuando la línea se desplaza en el espesor del corte y de nuevo aparece enfocada cortando a la línea verde sí se cuenta como intersección. Si la fibra se mantiene enfocada con la línea verde en movimiento durante varios planos focales, sólo se cuenta como una intersección.



**Figura 16. Intersecciones de fibras nerviosas con planos virtuales. A:** se observan 3 intersecciones, representadas en la imagen por una cruz. Se considera una intersección un corte de una línea verde con una fibra – o segmento axónico-enfocado. **B:** si la línea que representaba la intersección entre el plano virtual y el focal aparece en color rojo indica que está fuera del disector, en la zona de guarda superior, y aunque corte a una fibra enfocada no se considera una intersección.

La longitud total de axón (L) en el campo terminal fue estimada según la siguiente fórmula (Fórmula 1; Larsen y cols., 1998):

$$L = \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{hsf} \times d \times 2 \times \sum Q^-$$

**ssf** == Section sampling fraction = Fracción de muestreo de secciones = 1/f(s) siendo “s” el número que indica cada cuántas secciones se elige una en la que se realiza el muestreo.

**asf** = Area sampling fraction = Fracción de muestreo de área= 1 /f(a) siendo “a” el área de la caja o disector virtual.

**hsf** = Height sampling fraction = Fracción muestreo de altura = 1/(h) siendo “h” la altura del disector donde se realiza en muestreo.

**d** = distancia entre los planos virtuales.

**SumQ<sup>-</sup>** = Total de intersecciones entre fibras y planos virtuales.

En este trabajo se ha estimado la longitud de axón (L) en 9 campos axonales terminales de cuatro neuronas infectadas por el vector Sindbis-pal-GFP. Los parámetros estereológicos utilizados en cada campo terminal están especificados en la **Tabla 5**. La medida de L de los campos terminales empezaba en el punto en el que el axón principal o sus ramas entraban en la estructura diana. Dependiendo del tamaño del campo terminal, seleccionamos algunas secciones, comenzando por una de las secciones elegidas al azar y separadas con un intervalo constante (s), obteniendo entre 7-9 secciones por caso. Cada campo terminal fue delimitado a 10X y se le superponía una cuadrícula de cajas de muestreo que contenía los planos virtuales generados por la aplicación informática. Se contaron las intersecciones entre las fibras y los planos (Q) (**Figura 16**). Dejamos una zona de guarda superior e inferior a lo largo del eje de las Z de las secciones donde las fibras no se contaron. La zona de guarda superior fue siempre de 3 µm y el tamaño de la zona de guarda inferior se calculó restando del espesor de la sección la zona de guarda superior y la altura (h) de la caja de muestreo. Los parámetros de la cuadrícula y de la caja de muestreo fueron elegidos para obtener aproximadamente entre 100-200 intersecciones por campo terminal. Así el conteo de las intersecciones (Q) se llevó a cabo dentro de una caja virtual con una altura h y una superficie a (box). La distancia de separación entre planos era d. La distancia entre los

disectores se definía como  $dx.dy$ . Una vez establecidos los parámetros anteriores, se pinchaba sobre el icono de *Meander Sampling* y se determinaba la fracción de tejido que iba a ser analizada. En función de este parámetro variaba el número de cajas de muestreo que eran necesarios en cada sección, de tal forma que cuanto mayor era la fracción mayor era el número de cajas de muestreo por sección.

**Tabla 5.** Parámetros estereológicos para la estimación de la longitud de axón (L) de los campos axonales terminales de cuatro neuronas del VTA

LOCALIZACIÓN DEL CAMPO TERMINAL	ssf $\mu m$	tm $\mu m$	h (box) $\mu m$	a (box) $\mu m^2$	d (plano) $\mu m$	dx.dy $\mu m \times \mu m$
<sup>1</sup> CPu	2	17.60	10	2377	20	200
<sup>2</sup> Tu	2	13.53	8	1764	20	100
<sup>2</sup> VP	1	12.48	8	2343	10	60
<sup>3</sup> Corteza cerebral	4	18.84	10	2377	10	100
<sup>3</sup> Tu	2	20.39	10	2377	10	100
<sup>3</sup> AStr	1	20.66	10	2377	10	100
<sup>4</sup> LS	1	14.99	10	2351	10	100
<sup>4</sup> BSTL	2	17.85	10	2351	10	60
<sup>4</sup> AcbC	1	16.64	10	2351	10	60

Los superíndices indican los campos terminales proporcionados por la misma neurona. Así, por ejemplo, la neurona 2 proporcionó campos terminales en el Tu y en el VP.

a (box): área de la caja de muestreo; AcbC: núcleo accumbens, región *core*; AStr: área de transición amigdaloestriada; BSTL: núcleo del lecho de la estría terminal, división lateral; CPu: caudado-putamen; d (plano): distancia de separación entre planos; dx.dy: separación entre disectores; h (box): altura de la caja de muestreo; LS: núcleo septal lateral; ssf: fracción de muestreo de secciones; tm: espesor de sección media; Tu: tubérculo olfatorio; VP: pálido ventral.

Utilizando los datos anteriores y aplicando la Fórmula 1 para la estimación de la longitud de axón explicada anteriormente, se realizaba el cálculo de la longitud de axón mediante una hoja de cálculo Excel. Usando este método el resultado de la longitud de axón debería solamente ser afectado por el encogimiento de las fibras, que es comparable entre grupos.

## **RESULTADOS**

---

## 4.1 DELIMITACIÓN DE LAS SUBDIVISIONES DEL VTA EN EL RATÓN

Tal y como se explicó en la Introducción, el VTA comprende diversos núcleos o subdivisiones, cuya delimitación y nomenclatura varía según los autores (Swanson, 1982; Halliday y Törk, 1986; Ikemoto, 2007; Franklin y Paxinos, 2007; Yamaguchi y cols., 2011; Fu y cols., 2012). En nuestro estudio, para realizar la delimitación de las subdivisiones PBP, PN, rVTA y VTT en el plano sagital hemos seguido los criterios propuestos en el atlas de Franklin y Paxinos (2007) y en el artículo de Ikemoto (2007), basándonos principalmente en la tinción de TH y observando el tamaño y la forma de los somas de las neuronas dopaminérgicas, así como la orientación de su dominio somatodendrítico, que permiten delimitar esas diferentes regiones (Fu y cols., 2012). Las subdivisiones PBP y PN son ricas en somas dopaminérgicos (TH+), mientras que el rVTA y VTT contienen menos neuronas de este fenotipo neuroquímico (**Figura 17**).

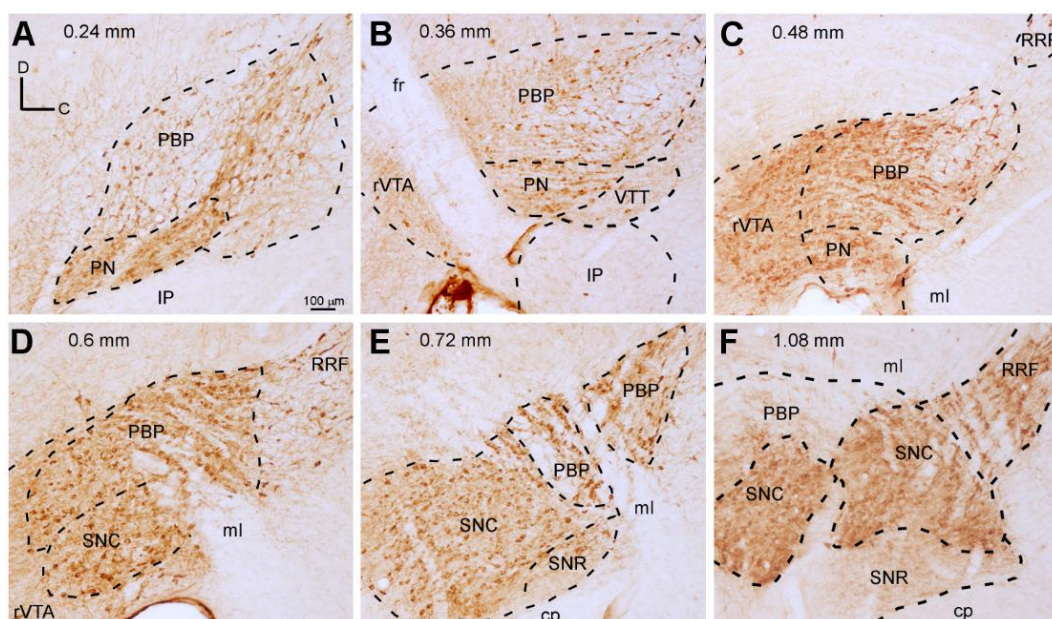
La subdivisión más grande del VTA es PBP, cuya extensión alcanza desde 0,24 a 1,08 mm con respecto a la línea media (**Figura 17**). En sus porciones más mediales, desde 0,24 a 0,48 mm lateral a la línea media, PBP se sitúa dorsal a PN y posterior al fascículo retrorreflejo y a rVTA (**Figura 17 A-C**), distinguiéndose PBP de PN por su menor densidad de neuropilo TH+ y por su ligera mayor densidad de somas TH+. En el nivel mediolateral de 0,6 mm, PBP se encuentra sobre la SNC, rostral a RRF y caudal a rVTA (**Figura 17 D**); el PBP y la SNC tienen una alta densidad de somas TH+ por lo que el límite entre ambas estructuras es difícil de definir con exactitud. A nivel de 0,72 mm el lemnisco medial (ml) atraviesa PBP (**Figura 17 E**), y desde 0,84 mm a 1,08 mm, PBP se encuentra entre el ml y la SNC (**Figura 17 F**).

El PN ocupa un volumen notablemente más pequeño que PBP, extendiéndose desde 0,24 a 0,48 mm lateral a la línea media (**Figura 17 A-C**). En su porción medial (entre 0,24 y 0,36 mm lateral a la línea media) se sitúa entre PBP e IP (**Figura 17 A, B**). El PN muestra una intensa tinción frente a la TH, y sus células dopaminérgicas se distinguen de las de PBP por su menor tamaño, por estar más aglutinadas y por tener un dominio somatodendrítico orientado en el plano horizontal.

En el territorio más rostral de VTA se encuentra el rVTA, que se extiende desde el nivel 0,36 a 0,6 mm lateral a la línea media (**Figura 17 B-D**), situándose rostral al

fascículo retrorreflejo, PBP, PN y SNC. Comparado con PBP y PN, rVTA tiene menor densidad de somas TH+ y éstos son más pequeños y están más débilmente teñidos en la región medial de rVTA que en la lateral.

La subdivisión VTT se localiza en la región más caudal del VTA, posterior a PN, ligeramente ventral al polo caudal de PBP y dorsal al IP a nivel mediolateral 0,36 mm (Figura 17 B). Esta región contiene somas celulares pequeños y moderadamente teñidos con TH pero su principal población neuronal es gabaérgica (Bourdy y Barrot, 2012). Aunque con tinción para TH esta zona es claramente distinta de PN y PBP, las características citoarquitectónicas de VTT con tinción de Nissl son similares a otras zonas del VTA, por lo que se ha incluido dentro del VTA, tal y como han propuesto otros autores (Ikemoto, 2007).

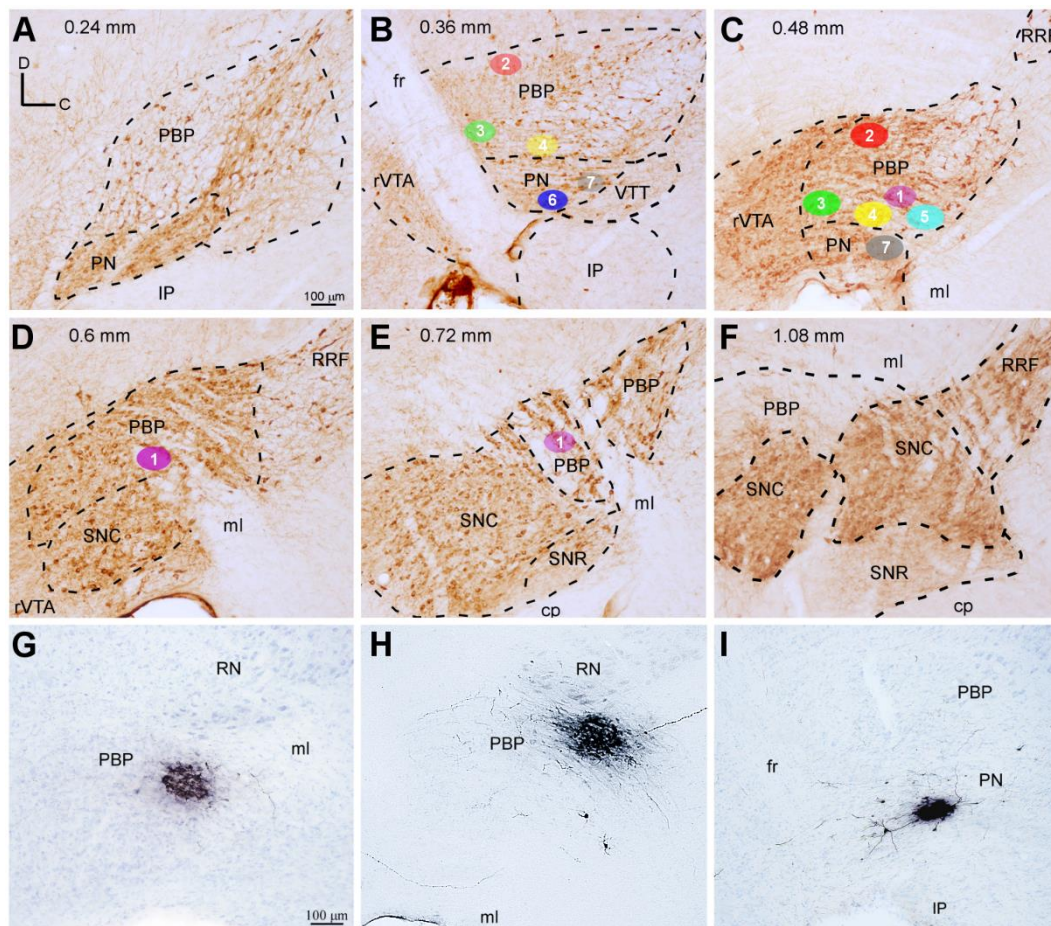


**Figura 17. Delimitación de las subdivisiones del VTA.** Secciones sagitales del mesencéfalo de un mismo ratón, con inmunotinción frente a la TH (A-F), mostrando la demarcación de PBP, PN, rVTA y VTT en diferentes niveles mediolaterales. Los valores en mm en la parte superior indican el nivel mediolateral más aproximado de la sección de acuerdo al atlas de Franklin y Paxinos (2007). La barra de calibración de A es válida para B-F. Véase la Lista de Abreviaturas.

## 4.2 ESTUDIO POBLACIONAL DE LAS PROYECCIONES EFERENTES DE LAS SUBDIVISIONES PBP Y PN DEL VTA

Para estudiar las proyecciones eferentes de las subdivisiones del VTA, realizamos microdepósitos del trazador BDA en estos territorios mesencefálicos. Sólo se han incluido en este trabajo aquellos microdepósitos que estaban confinados exclusivamente en una sola subdivisión del VTA, descartando las inyecciones que afectaban a más de una de estas regiones. De esta manera, en este estudio hemos analizado un total de siete microdepósitos de BDA, cinco de los cuales se localizan en PBP y dos en PN (**Figura 18**). Ninguna de las inyecciones de BDA realizadas en el rVTA quedó confinada exclusivamente en esa subdivisión, puesto que algunas invadían el fascículo retrorreflejo o el IP, por lo que fueron descartadas del estudio. Tampoco se logró ninguna inyección ubicada en VTT, por lo que no se pudo hacer el estudio poblacional de las proyecciones eferentes de esta subdivisión del VTA. Las microinyecciones de BDA consistían en un volumen pequeño y denso de neuropilo y somas celulares intensamente teñidos, muy frecuentemente rodeados de un número de cuerpos celulares que oscilaba entre 2 y 10 (**Figura 18**). La mayoría de estas neuronas marcadas con BDA en los alrededores de la inyección estaban muy próximas a los microdepósitos de BDA y en la misma subdivisión del VTA que éstos. Cuando se observó alguna neurona retrógradamente marcada ubicada lejos del depósito de BDA, su tinción era muy débil, con dendritas poco visibles y por tanto, insuficientemente marcadas como para proporcionar campos axonales terminales visibles (**Figura 13**).





**Figura 18. Localización de los microdepósitos de BDA.** A-F: secciones sagitales del mesencéfalo de un mismo ratón, con inmunotinción frente a la TH, en diferentes niveles mediolaterales (indicados en mm en la parte superior) en las que se ilustra la localización de los siete depósitos de BDA en PBP y PN, mediante elipses de diferentes colores numeradas. El núcleo principal del depósito tiene una coloración de mayor intensidad que su halo periférico. G-I: microfotografías de secciones sagitales del mesencéfalo de ratón, teñidas con tiónina, en las que se observan tres depósitos diferentes de BDA, dos localizados en PBP, (G-H), que se corresponden con los microdepósitos numerados con el 1 (G) y 2 (H) y otro localizado en PN (I), correspondiente con el del número 6. La barra de calibración de A es válida para B-F y la de G para H-I. Véase la Lista de Abreviaturas.

Los microdepósitos de BDA analizados proceden de 5 ratones con inyecciones bilaterales, tal y como se muestra en la **Tabla 6**, lo que impide descartar la existencia de posibles proyecciones contralaterales. Este aspecto, sin embargo, sí se analizó en las reconstrucciones de neuronas individuales que detallaremos en el capítulo 4.3 de los Resultados. Como se puede observar en la **Tabla 6**, en dos ratones las inyecciones de BDA estuvieron localizadas bilateralmente en PBP. En el ratón 3, la inyección en el hemisferio derecho se localizó en PBP y en el izquierdo en el lemnisco medial según atraviesa esa región ventral mesencefálica, pero no se encontraron proyecciones características del lemnisco medial en el lado derecho. En el ratón 4, la inyección en el hemisferio izquierdo fue muy débil y no produjo marcaje anterógrado. En el ratón 5, el



marcaje anterógrado procedente de la inyección de BDA en el lemnisco medial/sustancia negra del hemisferio izquierdo se confinó principalmente en el tálamo y en el estriado de ese mismo lado. Si bien no se puede descartar que haya algunas fibras teñidas a partir de este depósito que puedan haber atravesado la línea media y contribuido al marcaje observado en el tálamo contralateral.

**Tabla 6.** Microdepósitos de BDA analizados en este estudio

RATONES	HEMISFERIO	LOCALIZACIÓN DE LOS DEPÓSITOS DE BDA
1	Derecho	PBP (1*)
	Izquierdo	PBP (2*)
2	Derecho	PBP (4*)
	Izquierdo	PBP (3*)
3	Derecho	PBP (5*)
	Izquierdo	Lemnisco medial
4	Derecho	PN (6*)
	Izquierdo	-
5	Derecho	PN (7*)
	Izquierdo	Lemnisco medial/SNC+

\* El número indica el depósito de BDA ilustrado en la **Figura 18**

- El depósito de BDA era muy débil y no produjo marcaje anterógrado.

\* El marcaje de este depósito de BDA se confinó principalmente en el tálamo y estriado del hemisferio ipsilateral. La posibilidad de que algunas fibras teñidas a partir de este depósito puedan haber atravesado la línea media y contribuido al marcaje observado en el tálamo contralateral no se puede descartar.

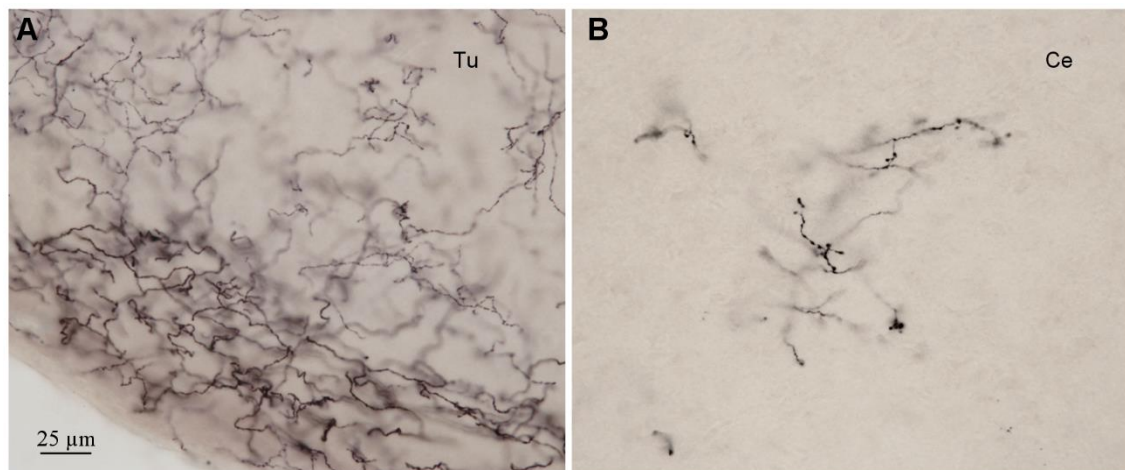
## 4.2.1 Proyecciones eferentes del PBP

### 4.2.1.1 Localización de los microdepósitos de BDA en PBP

Los resultados descritos en esta sección corresponden a los campos axonales terminales marcados a partir de los cinco microdepósitos de BDA ubicados en PBP, y que están identificados con números del 1 al 5 en la **Figura 18**. El núcleo central del microdepósito 1, donde el depósito de BDA era más denso y compacto, se situó a nivel mediolateral de 0,6 mm, extendiéndose su zona más periférica mucho más débilmente marcada, medialmente hasta el nivel 0,48 mm y, lateralmente a 0,72 mm, donde invadía muy ligeramente la SNC. Los otros cuatro depósitos de BDA se localizaron más medialmente, extendiéndose desde el nivel 0,48 mm lateral a la línea media, donde el depósito alcanzaba su mayor densidad, al 0,36 mm (**Figura 18**). La parte más periférica del microdepósito 4 invadió ligeramente la parte más dorsal de PN, pero dada la débil cantidad de BDA que penetró en PN y el hecho de que la distribución de los campos terminales axonales observados en este caso fue similar a la encontrada en otros depósitos localizados exclusivamente en PBP, hizo que este caso experimental no fuera descartado del estudio.

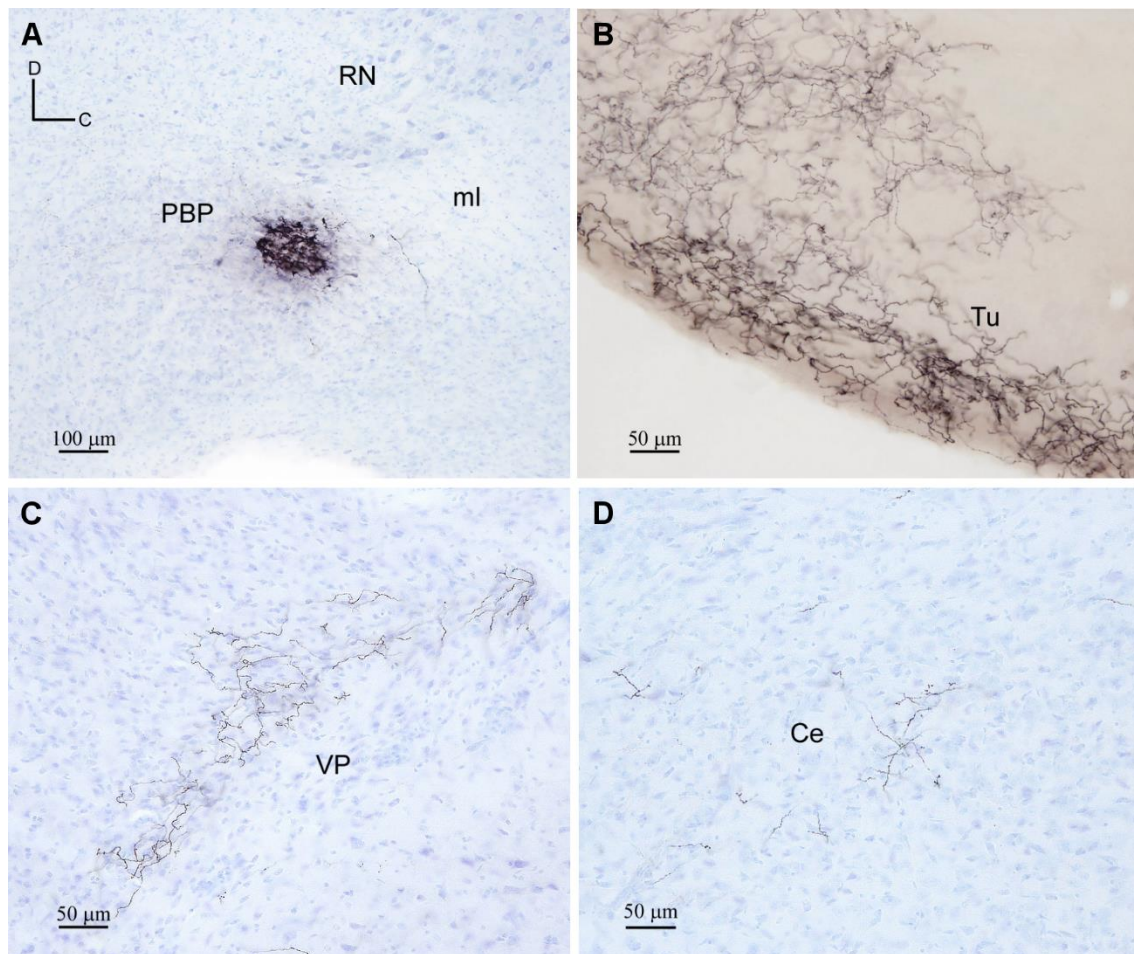
### 4.2.1.2 Distribución de los campos terminales axonales e intensidad de inervación

El marcaje de BDA en los campos terminales axonales procedentes de los microdepósitos en PBP se compone de colaterales de pequeño calibre con numerosas varicosidades redondas u ovaladas (**Figura 19**). Un mismo depósito de BDA da lugar a campos terminales axonales de diferentes tamaños y con distinta intensidad de fibras según la estructura diana inervada (**Figura 20 A-D**).



**Figura 19. Morfología de las fibras de los campos terminales marcados con BDA.** **A:** microfotografía a 40x de un campo terminal ubicado en el tubérculo olfatorio (Tu) procedente de un microdepósito de BDA localizado en PBP, en el que se observan numerosas fibras, tortuosas, de pequeño calibre con numerosas varicosidades redondas u ovaladas. **B:** microfotografía a 40x de un campo terminal ubicado en el núcleo amigdalino central (Ce) procedente del mismo microdepósito de BDA que el de A, en el que se muestran fibras nerviosas de similares características pero en menor número y en las que se aprecian con detalle sus varicosidades. La barra de calibración de A es válida para B.

En este estudio, basándonos exclusivamente en la cantidad de fibras terminales observadas en los distintos campos terminales, hemos clasificado de manera cualitativa la intensidad de inervación proporcionada por un mismo microdepósito de BDA en sus distintas estructuras diana como alta, media y baja, tal y como se muestra en la **Tabla 7**.



**Figura 20. Microdepósito de BDA localizado en PBP y sus campos terminales.** A: depósito de BDA localizado en PBP. B-D: campos terminales marcados con el BDA procedente del microdepósito mostrado en A, localizados en el tubérculo olfatorio (B), el pálido ventral (C) y el núcleo amigdalino central (D). Nótese la diferente densidad de fibras de los campos terminales, siendo alta en el tubérculo olfatorio (B), media en el pálido ventral (C) y baja en el núcleo amigdalino central (D). Todas son secciones sagitales teñidas con tionina.

Ce: núcleo amigdalino central; ml: lemnisco medial; PBP: núcleo parabraquial pigmentado; RN: núcleo rojo; Tu: tubérculo olfatorio; VP: pálido ventral.

Los campos terminales con mayor cantidad de colaterales axonales estaban localizados en estructuras relacionadas con el sistema olfatorio. Estas estructuras incluyen el área olfatoria anterior (AO), las islas de Calleja (ICj), el tubérculo olfatorio (**Figura 20 B**), la tenia tecta ventral (VTt) y la corteza piriforme (Pir) (**Tabla 7**). Las neuronas marcadas del PBP también proyectaron a otras múltiples áreas corticales, proporcionando campos terminales con alta cantidad de fibras en el caso de la corteza orbitaria lateral, la cual es el origen de abundantes proyecciones aferentes a las neuronas dopaminérgicas del VTA en el ratón (Watabe-Uchida y cols., 2012), y otros campos terminales con una intensidad de fibras más moderada en la corteza cingular, la frontal de asociación (FrA), orbitaria medial, prelímbica y también en el núcleo

endopiriforme dorsal y ventral (VEn). El PBP invió con baja intensidad, las cortezas insulares agranular (AI) y granular (GI), la dorsal peduncular (DP), las motoras primaria y secundaria (M2), la entorrinal medial (MEnt), las retroesplénicas granular (RSG) y agranular (RSA), la somatosensorial primaria (S1) y la orbitaria ventral (VO).

El caudado-putamen y la región *shell* del accumbens (AcbSh) fueron intensamente inervados por neuronas de PBP, mientras que la región *core* del accumbens (AcbC), el pálido ventral (**Figura 20 C**) y el núcleo septal lateral recibieron una inervación más moderada. Sin embargo, el complejo amigdalino, concretamente sus núcleos basolateral, central y medial (Me), y los núcleos septal medial y habenuar lateral fueron escasamente inervados (**Figura 20 D**). Las estructuras más inervadas a nivel diencefálico y troncoencefálico fueron el área hipotalámica lateral, el núcleo magnocelular del hipotálamo lateral y la parte oral del núcleo reticular pontino (PnO). El resto de estructuras troncoencefálicas mostraban una ligera tinción con baja intensidad de inervación (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Estructuras cerebrales inervadas por cada uno de los microdepósitos de BDA ubicados en PBP y su intensidad de inervación

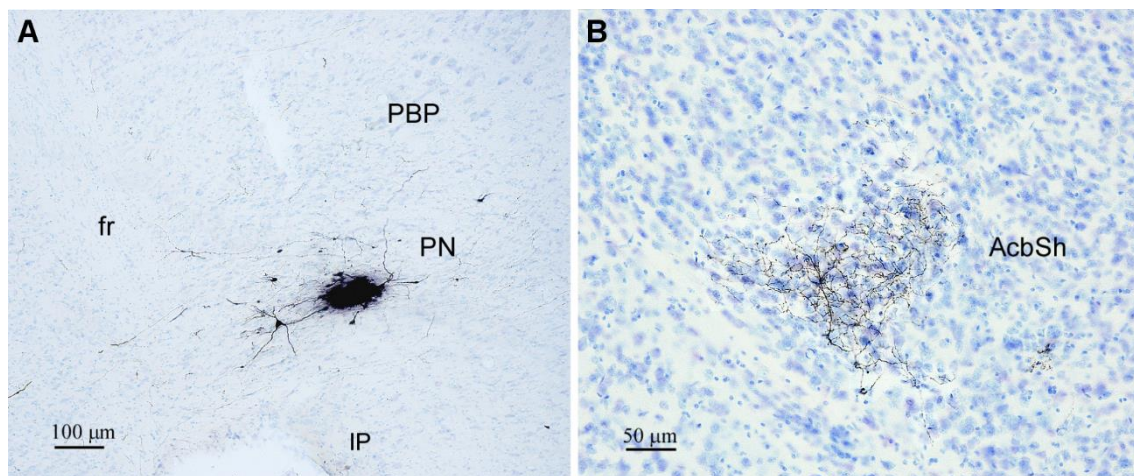
Depósito de BDA	Corteza cerebral	Estructuras olfatorias	Estriado y pálido ventral	Núcleos septales y DBB	Complejo amigdalino	Tálamo y epitálamo	Hipotálamo y PAG	SNC VTA RRF	Otras regiones tronco-encefálicas
1	LO Pir Cg1,Cg2 DEn,VEn FrA PrL AID,AIV DP GI S1	AOM,AOP AO V ICj Tu VTt DTT	AcbSh CPu AcbC VP	LSD LSI	BL CeC,CeL CeM BSTLD,BSTLP	AM LHb	LH MCLH PH AHP LPO PAG	PBP SNC RRF	PnO DpMe LDTg
2	Cg1,Cg2 FrA PrL DP GI RSG	AOM Tu VTt DTT	AcbSh VP	VDB LSI MS		CM MDM PVP Rh	MM PH SuMM PAG		PnO LDTg
3	Cg1,Cg2 DEn,VEn FrA MO PrL M2 VO	AOM DTT	AcbSh CPu VP	LSI MS	BL CeC MeAD		LH SuMM		
4	Cg1,Cg2 DEn PrL AID,AIV DP M1,M2 RSG RSA VO	AOP,AOV Tu	AcbSh AcbC		BSTLD, BSTLP		PAG		
5	FrA PrL DP MEnt RSG RSA						LH PAG	RRF	LDTg

Intensidad de inervación: Alta; Media; Baja. Véase la Lista de Abreviaturas.

## 4.2.2 Proyecciones eferentes de neuronas del PN

### 4.2.2.1 Localización de los microdepósitos de BDA en PN

Los dos microdepósitos de BDA ubicados en PN se situaron a 0,36 mm y 0,48 mm laterales a la línea media y aparecen identificados con los números 6 y 7 en la **Figura 18**. Ambos depósitos eran de muy pequeño tamaño y estaban perfectamente circunscritos a la subdivisión de PN (**Figura 21**). Otros depósitos de BDA ubicados en PN también contaminaron PBP o el IP por lo que fueron descartados de este estudio.



**Figura 21. Microdepósito de BDA localizado en PN y campo axonal terminal marcado a partir del mismo.** A: microfotografía de un depósito de BDA localizado en PN. B: microfotografía de un campo terminal marcado con BDA a partir de la inyección mostrada en A que se localiza en la región *shell* del núcleo accumbens. Ambas son secciones sagitales teñidas con tionina. AcbSh: región *shell* del núcleo accumbens; fr: fascículo retrorreflejo; IP: núcleo interpeduncular; PBP: núcleo parabraquial pigmentado; PN: núcleo paranigral.

### 4.2.2.2 Distribución de los campos terminales axonales e intensidad de inervación

Las estructuras inervadas por cada uno de los dos microdepósitos de BDA y la cantidad de inervación proporcionada en las estructuras diana, estimada cualitativamente, se resumen en la **Tabla 8**. Las características morfológicas de los campos terminales axonales marcados con BDA procedentes de neuronas de PN fueron muy similares a las observadas en las neuronas de PBP, estando compuestos por delgados axones provistos de múltiples varicosidades con forma redondeada u ovoide. Al igual que observamos en PBP, las neuronas de PN teñidas a partir de un microdepósito de BDA inervaron múltiples estructuras corticales y subcorticales con diferente intensidad. A diferencia de PBP, las proyecciones de PN a la corteza cerebral se



restringieron sólo a la corteza entorrinal [medial y lateral (LEnt)] que fue innervada con alta intensidad y a las cortezas piriforme y somatosensorial secundaria (S2), que fueron moderadamente innervadas. Las estructuras más intensamente innervadas por PN, además de la corteza entorrinal, fueron la región shell del núcleo accumbens (**Figura 21 B**), y el tubérculo olfatorio. Se observaron campos terminales axonales con intensidad de innervación moderada en el pálido ventral, subículo, área hipotalámica anterior (AHA) y lateral, sustancia gris periacueductal lateral (LPAG) y ventrolateral (VLPAG), y en algunos núcleos talámicos y troncoencefálicos, especificados en la **Tabla 8**. Los núcleos amigdalinos cortical (Co) y basomedial (BM) y los núcleos habenules lateral y medial fueron escasamente innervados.

**Tabla 8.** Estructuras cerebrales innervadas por cada uno de los dos microdepósitos de BDA ubicados en PN y su intensidad de innervación

Depósito de BDA	Corteza cerebral	Estriado Y pálido ventral	DBB	Complejo amigdalino e hipocampo	Tálamo y epitálamo	Hipotálamo y PAG	SNC VTA RRF	Otras regiones tronco-encefálicas
6	MEnt LEnt		HDB	Subículo ACo BMP PMCo	Rt LHbM	LPAG		DTgP DpG LDTg Pn APT MPT
7	Pir	AcbSh Tu VP	HDB	ACo	AM CM MDM PVP Re LHbM MHb	AHP,AHC LH LPAG,VLPAG	rVTA	DRD,DRV DTgP LDTg Pn

Intensidad de innervación: Alta; Media; Baja. Véase la Lista de Abreviaturas.

#### 4.3 PATRÓN DE ARBORIZACIÓN AXONAL DE NEURONAS INDIVIDUALES SITUADAS EN VARIAS SUBDIVISIONES DEL VTA

Los resultados descritos en las secciones anteriores, obtenidos a partir del análisis de los campos terminales marcados de microdepósitos de BDA ubicados en PBP y en PN, indican que estas subdivisiones innervan numerosas estructuras corticales y subcorticales prosencefálicas y troncoencefálicas. Como los microdepósitos de BDA



tiñen pequeños grupos neuronales, estos hallazgos sugieren que, al menos en estas dos subdivisiones principales de VTA, o bien existen varios tipos de neuronas de proyección que inervan diferentes estructuras diana y al encontrarse estrechamente entremezcladas su tinción hace que los campos terminales se diseminen ampliamente, o bien que las neuronas de estas regiones del VTA poseen axones muy ramificados que inervan simultáneamente diversas regiones dispersas por todo el cerebro. Para determinar si los patrones de inervación observados con los microdepósitos de BDA reflejaban la morfología axonal de neuronas individuales o una mezcla de diferentes tipos neuronales, llevamos a cabo el análisis de las ramificaciones axonales de neuronas únicas situadas en las diferentes subdivisiones de VTA.

Con este fin, en este estudio hemos analizado 30 neuronas infectadas por el vector viral Sindbis-pal-GFP. De las 30 neuronas completamente reconstruidas, 17 pertenecen a PBP, 5 neuronas a PN, y 7 neuronas estaban localizadas en el rVTA. La última neurona se ubicaba en la región del VTA que queda posterior al PN y que corresponde con lo que Ikemoto (2007) definió como VTT, caracterizada por poseer muy pocas neuronas TH+. Tal y como se explicó en el apartado 1.1.2 de la Introducción, esta región de VTT no se corresponde con lo que actualmente se identifica como cola del VTA (tVTA) o núcleo tegmental rostromedial (RMTg) (Barrot y cols., 2012; Yetnikoff y cols., 2014) que es una región mucho más extensa del tegmento mesopontino.

Como se ha mencionado en la Introducción, el VTA de roedores está poblada de neuronas con fenotipo neuroquímico muy diverso (Nair Roberts y cols., 2008; Yamaguchi y cols., 2011; Gorelova 2012). Aunque la población más numerosa de neuronas en el VTA es dopaminérgica, las neuronas gabaérgicas representan hasta un 33% y las glutamatérgicas un 2-3 % (Kawano y cols., 2006; Nair Roberts y cols., 2008; Morales y Root, 2014). Por esta razón, con el fin de caracterizar lo más completamente posible los tipos neuronales del VTA, además de reconstruir completamente la arborización axonal de neuronas individuales hemos tratado de determinar su fenotipo neuroquímico. De esta manera, en cada neurona infectada con el vector viral hemos determinado si expresa la TH, que es un marcador fiable de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo ventral (Fu y cols., 2012), y después hemos reconstruido su axón completo. De las 30 neuronas analizadas, 5 mostraron inmunorreactividad frente a la

TH, lo que acredita su naturaleza dopaminérgica. Las restantes 25 neuronas no fueron inmunorreactivas para esta proteína, aunque por las razones que se exponen en el apartado 5.1 de la Discusión, referente a algunas Consideraciones Metodológicas, no podemos asegurar que ninguna de ellas utilizase dopamina como neurotransmisor. Otro aspecto que hemos querido abordar en este estudio es la determinación de la cantidad de axón presente en algunos de los campos terminales principales proporcionados por cada axón, con el fin de aportar por primera vez datos cuantitativos de la cantidad relativa de axón que una misma neurona proporciona en diferentes dianas. Tal y como se explicó en el apartado 3.6.4 de Materiales y Métodos, este análisis se ha realizado por medios estereológicos.

Atendiendo a los patrones de arborización de los axones de las neuronas del VTA, se han diferenciado dos tipos diferentes de neuronas de proyección: (1) neuronas de proyección al prosencéfalo, y (2) neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo. En las secciones siguientes describiremos cada uno de estos dos tipos neuronales.

#### **4.3.1 Neuronas de proyección al prosencéfalo**

Un total de 18 neuronas del VTA, que representan el 60% de las neuronas reconstruidas en este estudio, poseían un axón principal que se dirigía rostralmente para inervar casi exclusivamente estructuras prosencefálicas corticales y subcorticales. Estas neuronas mostraron una notable diversidad y especificidad en las estructuras inervadas, por lo que las clasificamos en cuatro subtipos diferentes:

1. neuronas “mesocorticolímbicas”, cuyas proyecciones se dirigen tanto a la neocorteza como al prosencéfalo basal;
2. neuronas “mesocorticales”, que inervan casi exclusivamente a la neocorteza;
3. neuronas “mesolímbicas” que inervan el núcleo accumbens, el caudado-putamen y el prosencéfalo basal;
4. neuronas “mesoestriadas” que inervan casi exclusivamente el caudado-putamen.

A continuación vamos a describir cada uno de estos tipos neuronales.

#### **4.3.1.1 Neuronas mesocorticolímbicas**

En este tipo neuronal se incluyeron 2 de las 30 neuronas reconstruidas (6,6%). Estas neuronas mesocorticolímbicas se caracterizan por inervar la corteza cerebral y estructuras límbicas del prosencéfalo basal, tales como el tubérculo olfatorio, el pálido ventral y el complejo amigdalino (**Figura 22; Tabla 9**). Los somas de estas neuronas se localizaron en la región medial de PBP (a 0,48 mm lateral a la línea media) y tenían forma redondeada, emergiendo de ellos entre 4 y 6 dendritas primarias muy poco ramificadas. El análisis con microscopía confocal demostró que una de estas neuronas sí contenía la enzima TH, y por lo tanto, se consideró de naturaleza dopaminérgica (**Figura 22 B, C**; véase también la **Figura 28 D, G**).

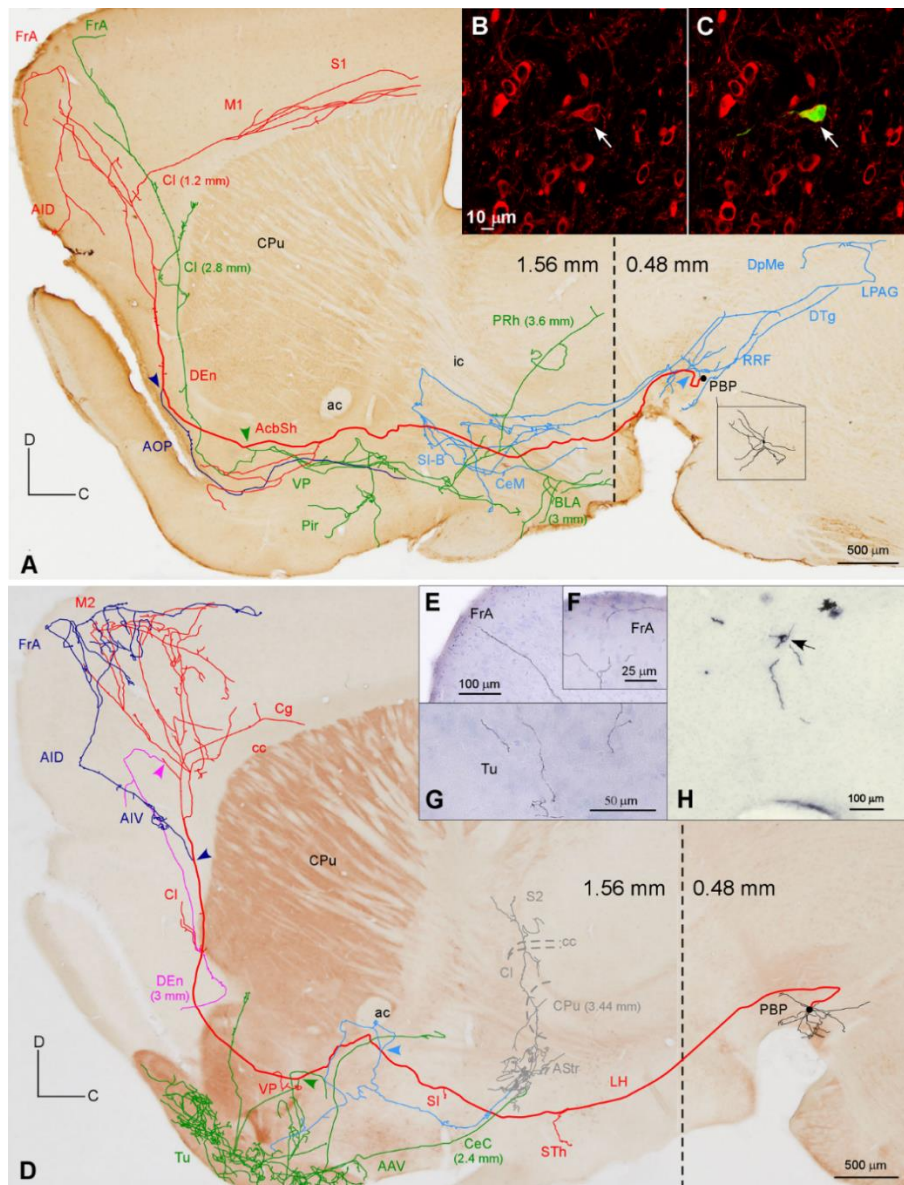
Los axones de ambas neuronas presentaron trayectorias y patrones de arborización muy complicados, los cuales aparecen representados en la **Figura 22**. Ambas neuronas mesocorticolímbicas tenían las siguientes características en común con respecto a la trayectoria y arborización de sus axones: nada más emerger del soma de la neurona, el axón atravesaba el área hipotalámica lateral y la sustancia innominada, emitiendo algunas colaterales de pequeño calibre y bastante cortas. Posteriormente, el axón penetró en el núcleo accumbens, y en este punto proporcionó varias colaterales que inervaron estructuras del prosencéfalo basal. Tras emerger del núcleo accumbens por su borde más rostral, el axón de estas neuronas penetró en el claustró, al que inervó, antes de alcanzar e inervar la corteza insular agranular y la corteza frontal de asociación (**Figura 22 A, D**).

En cuanto a las características específicas de cada uno de estos axones, tal y como se muestra en la **Figura 22**, el axón de la neurona mesocorticolímbica cuya naturaleza dopaminérgica pudo ser demostrada (**Figura 22 A-C; Tabla 9**: neurona 1) emitió una colateral dentro del mismo núcleo PBP en el que se localizaba el soma neuronal (ilustrada con el color azul claro en la **Figura 22 A**) que inervaba el campo retrorrubral, el núcleo mesencefálico profundo, la sustancia gris periacueductal lateral, el núcleo tegmental dorsal y el propio PBP, antes de alcanzar las regiones de la sustancia innominada, el núcleo basal de Meynert (B) y la división medial del núcleo amigdalino

central. La segunda colateral (ilustrada con color verde en la **Figura 22 A**) emergió del axón mientras éste atravesaba la región *shell* del núcleo accumbens y esta colateral innervó el pálido ventral, la corteza piriforme y más lateralmente el núcleo amigdalino basolateral y la corteza perirrinal (PRh). Al atravesar el axón principal el claustró, originó abundantes varicosidades o botones *en passant*, y una tercera colateral (de color azul oscuro en la **Figura 22 A**) que se dirigió ventralmente a través de la parte posterior del área olfatoria anterior hacia el pálido ventral. Finalmente, el axón innervó las cortezas frontal de asociación, insular agranular dorsal y las capas profundas de la corteza motora primaria y de la corteza somatosensorial primaria.

El axón de la segunda neurona mesocorticolímbica (**Figura 22 D-H; Tabla 9: neurona 2**) originó una corta colateral en el núcleo subtalámico y, antes de entrar en el núcleo accumbens, proporcionó su primera colateral de largo recorrido (de color azul claro en la **Figura 22 D**) que se dirigió lateralmente para innervar profusamente el área de transición amigdalóestriada antes de alcanzar e innervar la región más lateral del caudado-putamen, el claustró y la corteza somatosensorial secundaria. Mientras el axón principal atravesaba el pálido ventral, emitió una segunda colateral (de color verde en la **Figura 22 D**) que innervaba intensamente el tubérculo olfatorio y la parte ventral del área amigdalina anterior, después continuó hacia la parte capsular del núcleo amigdalino central y el área de transición amigdalóestriada donde se unió con la primera colateral e innervó la misma región lateral del caudado-putamen, el claustró y la corteza somatosensorial secundaria. Al acercarse el axón principal a la corteza cerebral, emitió algunas colaterales de pequeño calibre en el claustró y una tercera colateral (de color azul oscuro en la **Figura 22 D**) que innervó la corteza insular agranular y la corteza frontal de asociación. Finalmente se ramificó en numerosas fibras varicosas que se extendieron por todas las capas de la corteza motora secundaria y también por las capas profundas de la corteza somatosensorial secundaria y cingular, originando una última fibra que se dirigió ventrolateralmente hacia el núcleo endopiriforme dorsal.

La longitud de axón de los campos terminales proporcionados por esta última neurona en las cortezas motora secundaria, frontal de asociación e insular agranular ventral fue de 68,31 mm, en el tubérculo olfatorio fue de 31,92 mm y en el área de transición amigdalóestriada de 11,99 mm (**Tabla 10**).



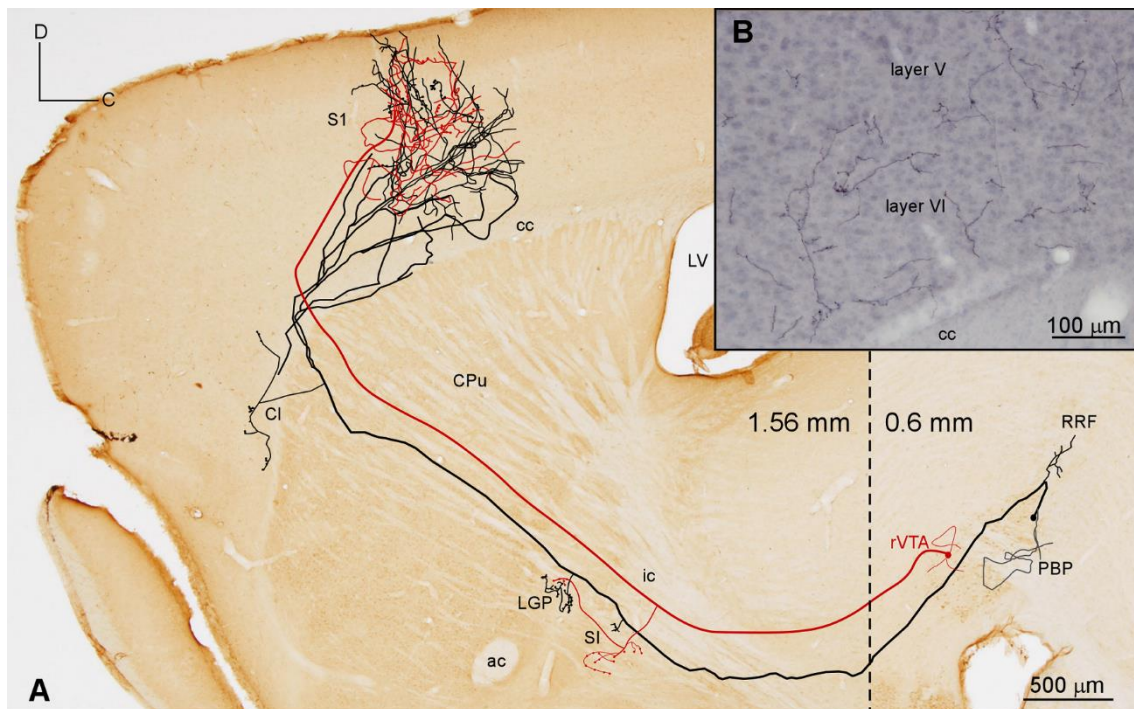
**Figura 22. Neuronas mesocorticolímbicas.** **A:** reconstrucción sagital de una neurona mesocorticolímbica dopaminérgica cuyo soma se ubica en PBP, sobre una composición de dos secciones sagitales, teñidas con calbindina, de dos niveles mediolaterales diferentes (0,48 y 1,56 mm, separados por una línea discontinua negra) según el atlas de Franklin y Paxinos (2007). El axón principal (grueso y rojo) alcanza la corteza cerebral después de originar tres colaterales principales que están señaladas con flechas, de caudal a rostral en azul claro, verde y azul oscuro. El nivel mediolateral donde se localizan los campos terminales cuando no se corresponde con el nivel de la sección de calbindina sobre la que se ha reconstruido la neurona es indicado entre paréntesis junto al nombre de la estructura innervada. **B:** imagen de microscopía confocal con inmunotinción frente a TH mostrando que el soma de la neurona reconstruida en A (flecha) es TH+ (roja). **C:** imagen de microscopía confocal en la que se observa la neurona TH+ reconstruida en A (flecha), expresando pal-GFP (verde) tras ser infectadas por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP. **D:** reconstrucción sagital de una neurona mesocorticolímbica cuyo soma se ubica en PBP, sobre una composición de dos secciones sagitales, teñidas con acetilcolinesterasa, de dos niveles mediolaterales diferentes (0,48 y 1,56 mm) separados por una línea discontinua negra. El axón principal (grueso y rojo) proporciona tres colaterales principales, señaladas con cabezas de flechas en azul claro, verde y azul oscuro, alcanzando finalmente la corteza cerebral. Los campos terminales originados a partir de las colaterales azul claro y verde ubicados en Astr, CPu, CI y S2, alcanzan niveles muy laterales, indicados en color gris. **E-H:** microfotografías mostrando fibras terminales en la corteza cerebral (E-F) y en el tubérculo olfatorio (G) y el soma de la neurona ubicada en PBP (H). Véase la Lista de Abreviaturas.

#### 4.3.1.2 *Neuronas mesocorticales*

De las 30 neuronas reconstruidas, 2 (6,6%) tenían axones que inervaron profusamente y casi de manera exclusiva la corteza somatosensorial primaria, por lo que se definieron como neuronas mesocorticales (**Figura 23 A; Tabla 9**). El soma de una de estas neuronas se localizó en el sector caudal de PBP, a 0,6 mm lateral a la línea media (**Tabla 9: neurona 3**), y el soma de la otra (**Tabla 9: neurona 4**) estaba ubicado en el rVTA, a 0,48 mm de la línea media (**Figura 28 D, E, G**). Ambos somas eran ovoideos y de ellos emergían dos o tres dendritas primarias escasamente ramificadas. El análisis de microscopía confocal de la expresión de TH en estas neuronas demostró que ninguna de ellas contenía esta enzima, considerándose entonces como de naturaleza no dopaminérgica.

El axón de la neurona localizada en la subdivisión PBP del VTA (**Figura 23 A**), después de emitir una colateral que inervó el PBP del lado contralateral, se dirigió rostralmente proporcionando dos cortas colaterales que inervaron muy ligeramente la sustancia innominada y el globo pálido lateral (LGP), para después atravesar el caudado-putamen sin inervarlo, y emitir una sola colateral de pequeño calibre en el claustró. Finalmente, el axón principal entró en la corteza somatosensorial primaria, ramificándose en numerosas y delgadas fibras terminales por todas las capas de esta corteza (**Figura 23 B**).

El axón de la otra neurona mesocortical cuyo soma se localizó en la subdivisión rVTA del VTA realizó un recorrido similar al que acabamos de describir excepto que también inervó de manera moderada la corteza somatosensorial secundaria. Dado que las dos neuronas mesocorticales reconstruidas en este estudio estaban ubicadas en el mismo hemisferio del mismo ratón, ambos axones confluyeron en la corteza somatosensorial primaria, haciendo imposible separar los campos terminales proporcionados por cada una de las dos neuronas. Por esta razón, el campo terminal de alta densidad de fibras situado en la corteza somatosensorial primaria, representado en la **Figura 23 A**, pertenece a las dos neuronas mesocorticales, impidiendo entonces poder estimar la longitud de axón proporcionada en la corteza cerebral por cada neurona.



**Figura 23. Neuronas mesocorticales.** **A:** reconstrucción sagital de dos neuronas mesocorticales sobre una composición de dos secciones sagitales teñidas con calbindina de niveles mediolaterales diferentes (0,6 mm y 1,56 mm, según el atlas de Franklin y Paxinos de 2007) separados por una línea negra discontinua. La colateral que se origina en PBP inerva el PBP contralateral. **B:** microfotografía de las fibras de los campos terminales localizados en las capas profundas de S1 procedentes de las dos neuronas. Véase la Lista de Abreviaturas.

#### 4.3.1.3 Neuronas mesolímbicas

De las 30 neuronas reconstruidas, 12 (40%) se consideraron mesolímbicas porque sus axones inervaron principalmente estructuras límbicas del prosencéfalo basal como el tubérculo olfatorio, el núcleo accumbens, el pálido ventral, el núcleo septal lateral, la división lateral del núcleo del lecho de la estría terminal y la amígdala. Los somas de estas neuronas mesolímbicas se ubicaron en varias subdivisiones del VTA: PBP (5 neuronas), PN (5 neuronas) y rVTA (2 neuronas) (véase la **Figura 28 B-E, G**). Estos somas tenían forma poligonal, fusiforme u ovoidea y de ellos surgían entre 3 y 4 dendritas poco ramificadas (**Figura 24 E**). En este grupo de neuronas se pudo demostrar el fenotipo dopaminérgico en una neurona de PBP (**Figura 24 A; Tabla 9: neurona 7**), dos neuronas de PN (**Figura 24 E; Tabla 9: neuronas 12 y 14**) y una de rVTA (**Figura 28 B-E, G; Tabla 9: neurona 16**); en el resto de neuronas no se visualizó la expresión de la TH y fueron consideradas como no dopaminérgicas.

Las principales estructuras inervadas por este tipo de neuronas fueron el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio, si bien ambos territorios no fueron inervados por

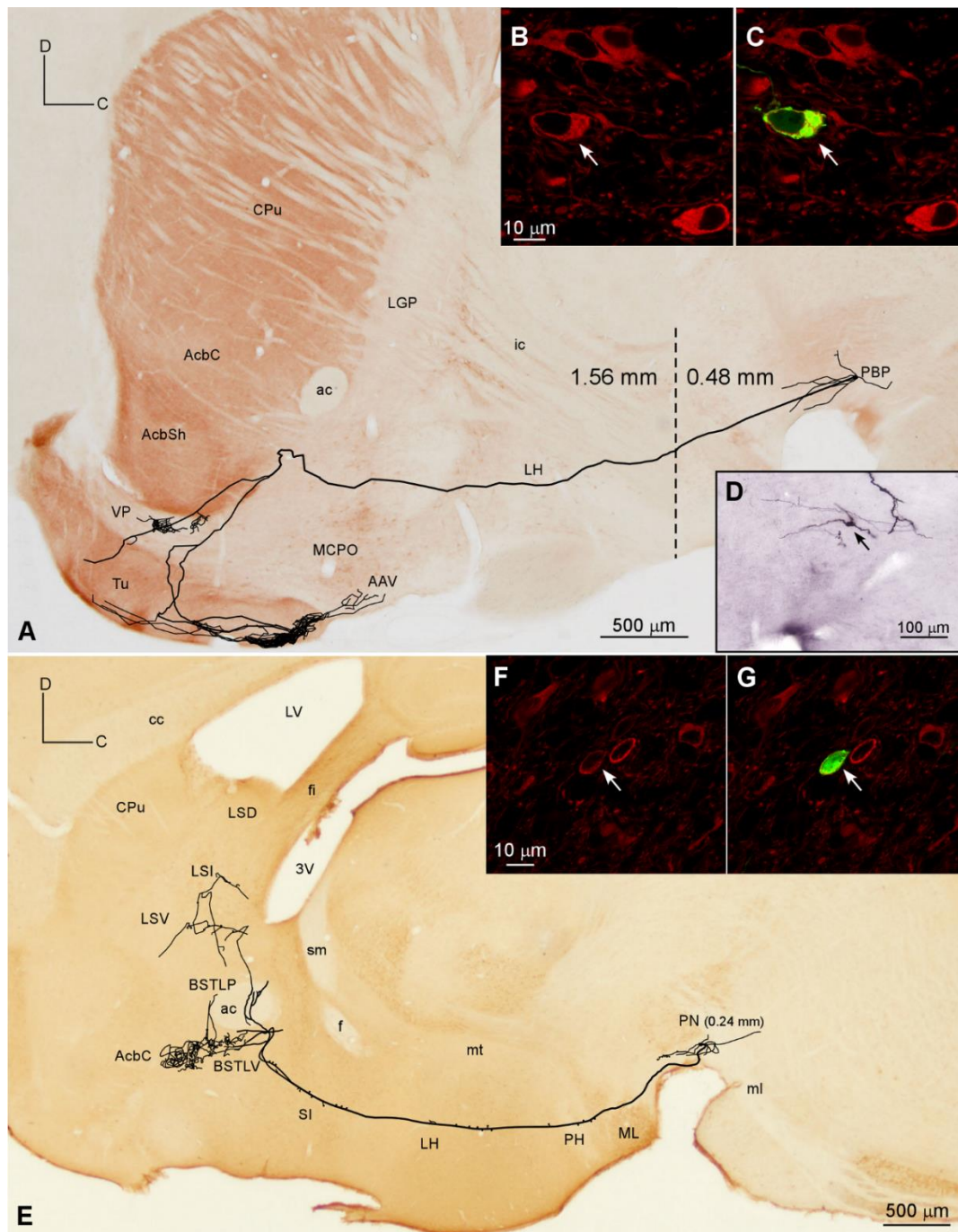
las mismas neuronas. El tubérculo olfatorio junto con el pálido ventral recibió innervación de 3 neuronas (**Figura 24 A**; **Tabla 9**: neuronas 7, 10, 14) situadas en la región ventral de VTA y otra neurona (**Tabla 9**: neurona 11) ubicada en esta región innervó el tubérculo olfatorio pero no el pálido ventral. Una de esas 3 neuronas se demostró que era dopaminérgica (**Figura 24 A**; **Tabla 9**: neurona 7), y su soma se encontraba en la zona ventral de PBP (nivel mediolateral 0,48 mm) (**Figura 24 A-D**) El axón de esta célula atravesaba el área hipotalámica lateral y la sustancia innominada, bifurcándose en la región *shell* del núcleo accumbens en una colateral que innervó el pálido ventral y en otra que cuando entró en el tubérculo olfatorio se ramificó en numerosas fibras terminales varicosas que innervaron su región más caudoventral. La longitud de axón de los campos terminales en el tubérculo olfatorio fue de 86,82 mm y en el pálido ventral de 6,14 mm (**Tabla 10**). Las otras tres neuronas que innervaron el tubérculo olfatorio tenían sus somas en PN. La primera de ellas era dopaminérgica (**Tabla 9**: neurona 14) y su axón emitió una colateral que innervó el pálido ventral, para después el axón penetrar en el tubérculo olfatorio donde se ramificó profusamente, extendiéndose sus fibras terminales también en las Islas de Calleja. La segunda neurona (**Tabla 9**: neurona 10) innervó las capas más profundas del tubérculo olfatorio, el pálido ventral, la capa más superficial de la corteza piriforme y la amígdala y fue la única neurona de este grupo que proporcionó colaterales locales en PN y en PBP. La tercera neurona (**Tabla 9**: neurona 11) innervó escasamente el tubérculo olfatorio, el área olfatoria anterior, el área preóptica lateral y el núcleo del lecho de la estría terminal. Además de las estructuras mencionadas anteriormente innervadas por cada neurona, existen otras regiones neurales que también recibieron pequeñas innervaciones a cargo de colaterales pequeñas emitidas por los axones y que, aunque no han sido nombradas en aras de una mayor claridad, pueden revisarse en la **Tabla 9**, que contiene todas las estructuras nerviosas innervadas por cada una de las 30 neuronas reconstruidas en este estudio.

El núcleo accumbens fue innervado por seis neuronas cuyos axones, después de atravesar el área hipotalámica lateral y la sustancia innominada sin emitir ninguna colateral, mostraron diferentes patrones de arborización. Los somas de dos de éstas neuronas (**Tabla 9**: neuronas 5 y 6) se situaban en la región lateral de PBP (nivel mediolateral 0,6 mm) y tuvieron como única diana de innervación la región *core* del



núcleo accumbens, donde originaron un gran campo terminal, y una de ellas innervó también con baja intensidad la banda lateral del estriado (LSS). Las otras cuatro neuronas innervaron además del núcleo accumbens otras estructuras como el caudado-putamen (**Tabla 9**: neuronas 8, 12, 15, 16), y la ramificación de sus axones en el núcleo accumbens fue menor que la de las dos neuronas cuya única diana fue el accumbens. Una de ellas (neurona 8) se situó en PBP medial (0,36 mm lateral a línea media) y su axón atravesó la línea media e innervó moderadamente regiones contralaterales como el *core* del núcleo accumbens y la región central del caudado-putamen. Otras dos neuronas (neuronas 15 y 16) cuyos somas, uno de ellos dopaminérgico, se situaban en rVTA (a 0,6 mm de la línea media) innervaron moderadamente la zona lateral de la región *shell* del accumbens y el caudado-putamen (la zona dorsocaudal en el caso de la neurona dopaminérgica y el sector ventral del caudado-putamen en la otra). Finalmente, el axón de una neurona dopaminérgica con el soma localizado en PN (**Tabla 9**: neurona 12, **Figura 24 E-G**) atravesaba el área hipotalámica lateral dejando “*boutons en passant*” antes de ramificarse en la parte ventral de la división lateral del núcleo del lecho de la estría terminal, en la región *core* del accumbens y en el núcleo septal lateral. La longitud de axón de los campos terminales en la división lateral del núcleo del lecho de la estría terminal fue de 7,56 mm, en la región *core* del accumbens de 7,2 mm y en el núcleo septal lateral de 10,07 mm (**Tabla 10**).

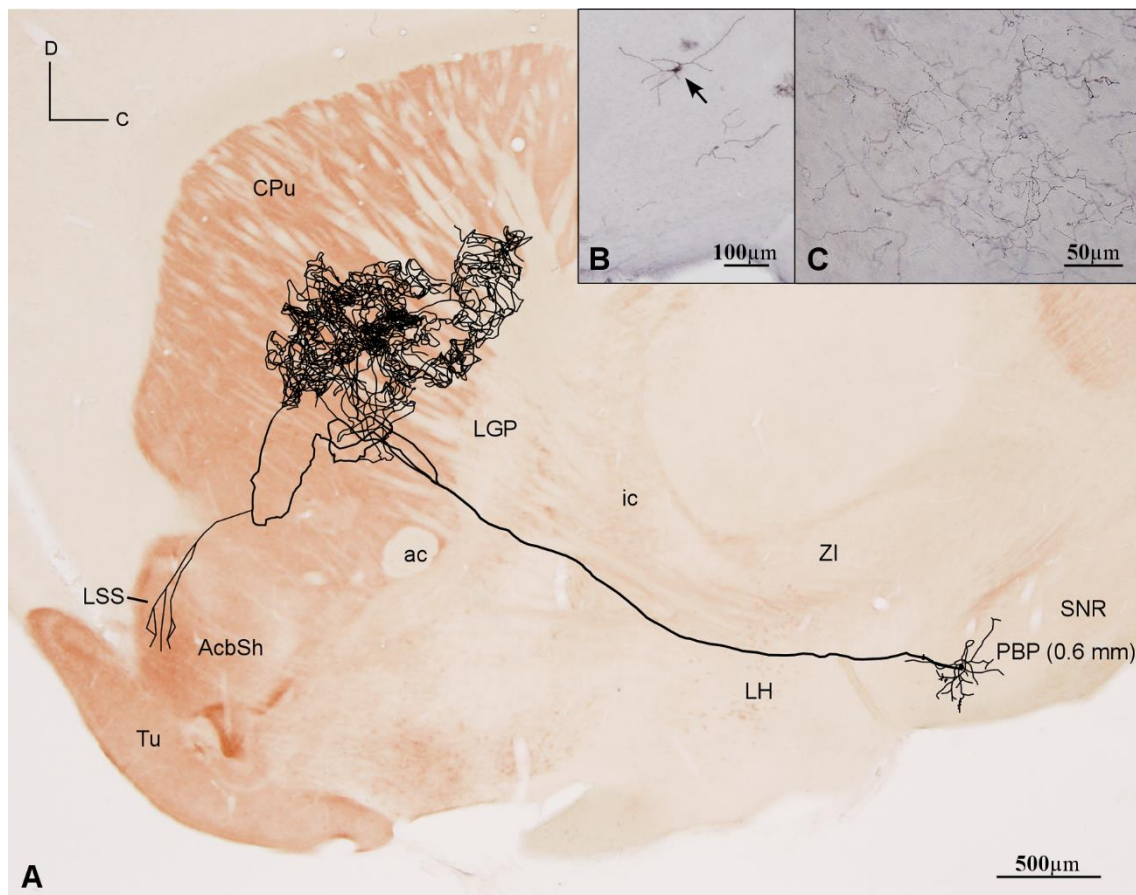
Varias de las neuronas mesolímbicas no innervaron el tubérculo olfatorio ni el núcleo accumbens, como es el caso de una neurona (**Tabla 9**: neurona 13) ubicada en PN (0,24 mm lateral a línea media) que innervó exclusivamente el núcleo septal lateral o de otra neurona (**Tabla 9**: neurona 9) cuyo soma se situaba en PBP (a 0,36 mm lateral a la línea media) que innervó el sector ventrolateral del caudado-putamen, la parte capsular del núcleo amigdalino central, el núcleo basal de Meynert y el núcleo intersticial del brazo posterior de la comisura anterior (IPAC).



**Figura 24. Neuronas mesolímbicas.** **A:** reconstrucción sagital de una neurona mesolímbica, cuyo soma se sitúa en PBP, sobre una composición de dos secciones sagitales una medial (0,48 mm) y caudal y la otra lateral (1,56 mm) y rostral, ambas teñidas frente a acetilcolinesterasa y separadas por una línea negra discontinua. **B:** imagen de microscopía confocal con inmunohistoquímica para la TH, mostrando que el soma de la neurona reconstruida en A es TH+. **C:** imagen de microscopía confocal en la que se observa el soma de la neurona (flecha) reconstruida en A, expresando pal-GFP (verde) tras ser infectada por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP. **D:** microfotografía del dominio somatodendrítico de la neurona reconstruida en A. **E:** reconstrucción sagital de una neurona mesolímbica, cuyo soma se sitúa en PN (a 0,24 mm lateral a la línea media, indicado entre paréntesis), sobre una sección sagital, teñida para calbindina, a 0,48 mm lateral a la línea media. **F:** imagen de microscopía confocal con inmunohistoquímica para la TH, mostrando que el soma de la neurona reconstruida en D es TH+. **G:** imagen de microscopía confocal en la que se observa el soma de la neurona (flecha) reconstruida en A, expresando pal-GFP (verde) tras ser infectadas por el pseudovirión Sindbis-pal-GFP. Véase la Lista de Abreviaturas.

#### **4.3.1.4 Neuronas mesoestriadas**

En este grupo de neuronas mesoestriadas del VTA se han incluido a 2 neuronas de las 30 reconstruidas (6,6%). Estas neuronas se caracterizaron porque sus axones se dirigían directamente al caudado-putamen atravesando el área hipotalámica lateral y la cápsula interna, y sin proporcionar ninguna colateral ni botón terminal durante su recorrido. Los cuerpos celulares de estas neuronas se localizaron en PBP a 0,6 mm lateral a la línea media (**Figura 25 A-C; Tabla 9:** neurona 17) y en rVTA (**Tabla 9:** neurona 18; véase también la **Figura 28 E, G**) y sus cuerpos celulares fueron de forma ovoidea con entre 3 y 5 dendritas muy ramificadas en los alrededores del soma. El axón de la neurona de PBP, se ramificó profusamente dentro del sector central del caudado-putamen, dando lugar a un campo terminal muy denso, cuya longitud de axón estimada fue de 229,82 mm (**Tabla 10**). Este axón emitió una única colateral que se dirigió a la banda lateral del estriado (**Figura 25 A**) originando un campo terminal con una longitud de axón de 5,56 mm. La otra neurona mesoestriada invió la región dorsal del caudado-putamen y la banda subcallosa, proporcionando un denso campo terminal con numerosas ramificaciones varicosas.



**Figura 25. Neurona mesoestriada.** A: reconstrucción sagital de una neurona mesoestriada, cuyo soma se localiza en PBP, sobre una sección sagital, teñida frente a acetilcolinesterasa, correspondiente con un nivel mediolateral de 1,56 mm lateral a la línea media. El nivel mediolateral en el que se sitúa el soma es de 0,6 mm y está indicado entre paréntesis B: microfotografías del soma de la neurona reconstruida en A. C: microfotografías de fibras terminales de la región central del caudado-putamen. Véase la Lista de Abreviaturas.

### 4.3.2 Neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo

En esta categoría se han incluido 12 neuronas (40%) de las 30 reconstruidas. Estas neuronas se caracterizan por tener axones muy ramificados en la proximidad del soma, originando numerosas ramas colaterales que se distribuyen ampliamente por el encéfalo para inervar diversas estructuras del prosencéfalo y sobre todo del tronco del encéfalo. Los cuerpos celulares de estas neuronas eran de forma ovoidea o fusiforme (**Figura 26 B**) y de ellos surgían entre 3 y 5 dendritas primarias. Ninguna de las 12 neuronas de este grupo expresó la proteína TH, por lo que fueron consideradas como no dopaminérgicas. A diferencia de otras neuronas muy ramificadas como es el caso de las mesocorticolímbicas, en las que se identificaba claramente un axón principal de mayor grosor que emergía de VTA en dirección rostral, los axones de estas neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo se ramificaban en numerosas colaterales de similar grosor dentro de VTA, impidiendo, por lo tanto identificar un axón principal. Además, otra diferencia con el resto de tipos neuronales identificados en este estudio fue que los campos terminales que proporcionaban en sus estructuras diana las diversas ramas axónicas de las neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo, eran muy pequeños en extensión y con poca densidad de fibras terminales; aunque las características morfológicas de las fibras terminales de estas neuronas eran similares a los proporcionados por los otros tipos neuronales, incluso comparando con neuronas cuya naturaleza dopaminérgica había sido demostrada en el estudio de microscopía confocal (**Figura 27**).

Las estructuras inervadas por las neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo están resumidas en la **Tabla 9**. Estas neuronas inervaron preferentemente a estructuras del tronco del encéfalo, pero todas ellas emitieron al menos una colateral, la cual emergía del soma neuronal de manera independiente respecto a las que inervaban el tronco del encéfalo, que se dirigía rostralmente para inervar estructuras diencefálicas o prosencefálicas no corticales. Un ejemplo de este tipo de neuronas se muestra en la **Figura 26 A-B** donde se puede apreciar la corta trayectoria del axón en sentido dorsocaudal a través del campo retrorrubral y su temprana

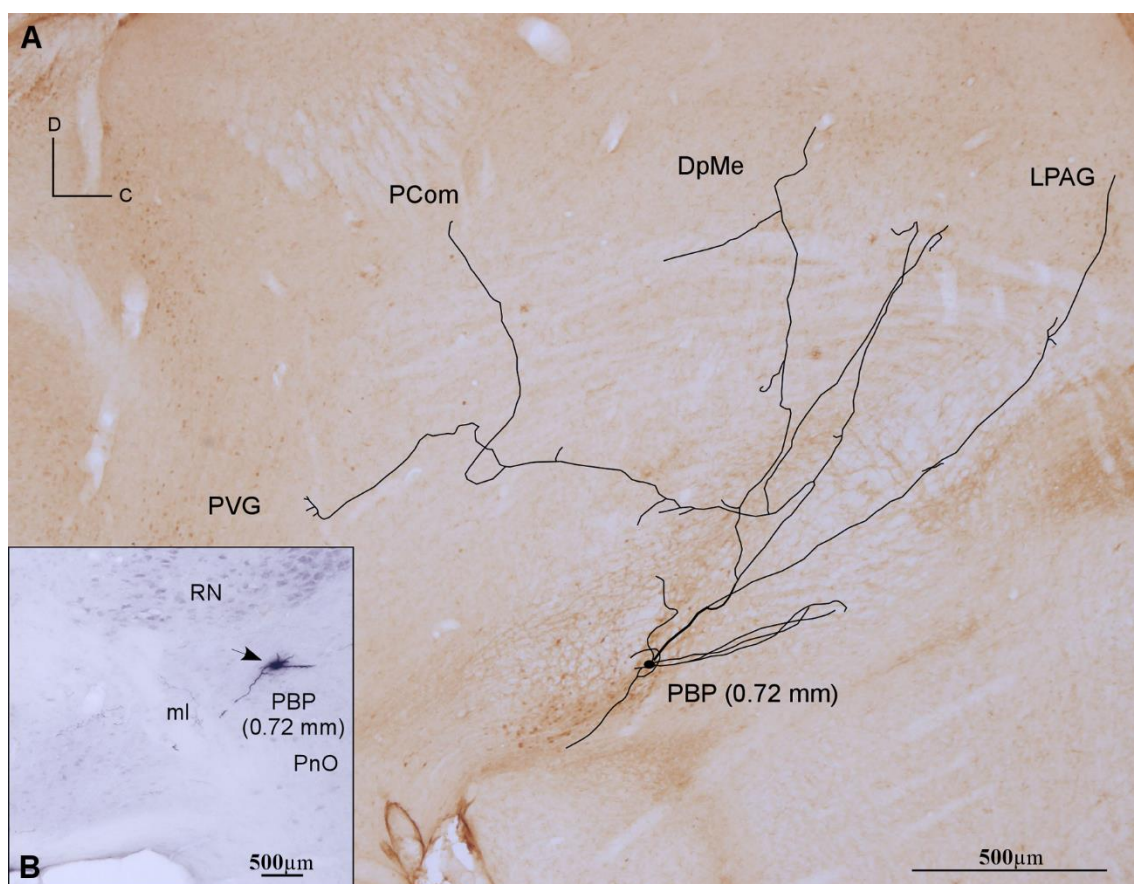
ramificación en colaterales de menor calibre que inervaron el núcleo mesencefálico profundo, la sustancia gris periacueductal lateral, el núcleo de la comisura posterior (PCom) y la sustancia gris periventricular (PVG). En la **Tabla 9** se describe detalladamente el patrón de arborización de cada una de estas neuronas.

El hipotálamo fue una de las estructuras más frecuentemente inervadas por estas neuronas (9 de las 12). En dos casos (**Tabla 9**: neuronas 21 y 24), cuyos somas estaban localizados en PBP, destacó la inervación del área hipotalámica lateral y otra neurona también ubicada en PBP (**Tabla 9**: neurona 25) invió principalmente el núcleo hipotalámico posterior. Otras cuatro neuronas también inervaron el área hipotalámica lateral, dos de ellas eran de PBP (**Tabla 9**: neuronas 19 y 22), una de rVTA (**Tabla 9**: neurona 27) y otra de VTT (**Tabla 9**: neurona 30), pero la inervación del área hipotalámica lateral proporcionada por estas cuatro neuronas fue de menor intensidad que la proporcionada por las neuronas 21 y 24 en el área hipotalámica lateral y en el núcleo hipotalámico posterior. La estructura neural más rostral inervada fue el núcleo del brazo horizontal de la banda diagonal de Broca (HDB) que fue inervado por dos neuronas ubicadas en PBP (**Tabla 9**: neuronas 21 y 26) y por otras dos ubicadas en rVTA (**Tabla 9**: neuronas 28 y 29).

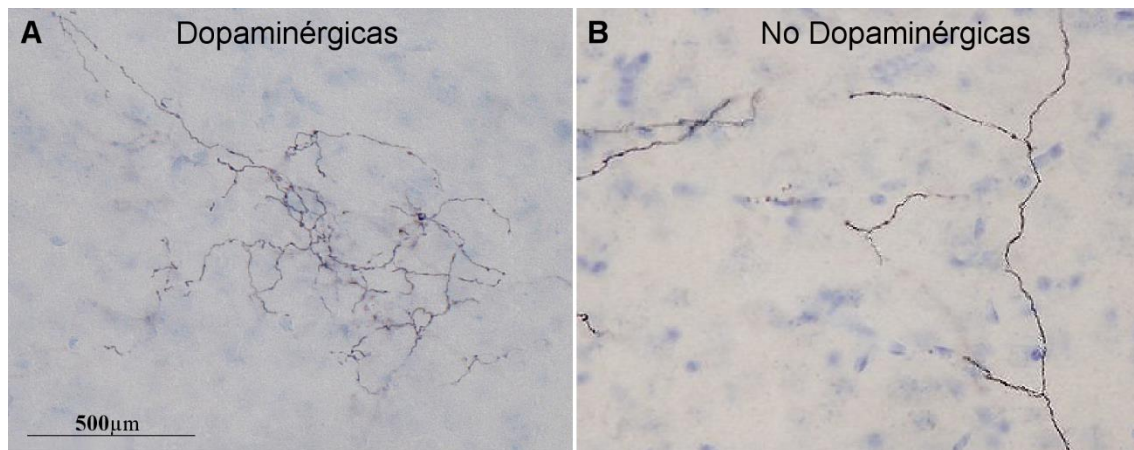
Dos de las neuronas ubicadas en PBP inervaron el complejo amigdalino, concretamente el núcleo amigdalino basomedial (**Tabla 9**: neurona 22), y la división medial del núcleo central y el núcleo medial (**Tabla 9**: neurona 24). Los axones de otras neuronas sólo llegaron hasta la sustancia innominada y el núcleo del lecho de la estría terminal o el tálamo como es el caso de una neurona (**Tabla 9**: neurona 19) situada en PBP lateral (a 0,72 mm lateral a la línea media) que invió el núcleo talámico mediodorsal contralateral después de originar escasas colaterales en varias estructuras mesencefálicas contralaterales, además de proporcionar una notable inervación bilateral del núcleo olivar inferior. El resto de campos terminales del tálamo se observaron en los núcleos talámicos de la línea media [reuniens (Re), romboidal (Rh) y paraventricular] y en el núcleo submedio y procedían de neuronas situadas en rVTA (neurona 27) o en VTT (neurona 30).



En cuanto a la innervación del tronco del encéfalo, la mitad de las neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo (**Tabla 9**: neuronas 19, 21, 22, 23, 25, 26) proporcionaron colaterales locales en VTA, SNC y campo retrorrubral, siendo en ocasiones contralaterales. La sustancia gris periacueductal y el núcleo tegmental laterodorsal fueron dianas frecuentes de este tipo de neuronas y algunos casos fueron la principal estructura innervada por neuronas de rVTA (**Tabla 9**: neurona 28) o VTT (neurona 30). Otras estructuras caudales innervadas por estas neuronas fueron el núcleo tegmental reticulopontino (RtTg) o los núcleos del rafe (dorsal y paramediano).



**Figura 26. Neurona de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo.** **A:** reconstrucción sagital de una neurona de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo, cuyo soma se ubica en PBP, sobre una sección sagital, teñida frente a calbindina, correspondiente con un nivel mediolateral de 0,24 mm lateral a la línea media. El nivel mediolateral en el que se sitúa el soma es de 0,72 mm y está indicado entre paréntesis **B:** microfotografías del soma de la neurona reconstruida en A. Véase la Lista de Abreviaturas.



**Figura 27. Morfología de fibras terminales dopaminérgicas y no dopaminérgicas.** **A:** fibras de un campo terminal situado en el núcleo septal lateral, proporcionado por una neurona mesolímbica dopaminérgica (ilustrada en la **Figura 24 E**). **B:** fibras de un campo terminal localizado también en el núcleo septal lateral, procedente de una neurona de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo, no dopaminérgica.



Tabla 9. Tipos de neuronas de proyección del VTA

TIPO	N	LOCALIZACIÓN (nivel mediolateral; figura)	NT	ESTRUCTURAS DIANA	
NEURONAS DE PROYECCIÓN AL PROSEN- CÉFALO	Meso- cortico- límbicas	1	PBP (0,48 mm; <b>Figura 22 A</b> )	DA	FrA, AID, M1, S1, PRh, DEn, Cl, AOP, SI, B, BLA, CeM, MeAD, LPAG, PBP, RRF, DTg, DpMe
		2	PBP (0,48 mm; <b>Figura 22 D</b> )	-	FrA, AID/AIV, <b>M2</b> , S2, DEn, Cg, Cl, <b>Tu</b> , CPu, STh (anteromedial), SI, VP, <b>AStr</b> , AAV
	Meso- corticales	3	PBP (0,6 mm; <b>Figura 23 A</b> )	-	<b>S1</b> , Cl, LGP, SI, B, PBP (contralateral), RRF
		4	rVTA (0,48 mm; <b>Figura 23 A</b> )	-	<b>S1</b> , S2, LGP, SI, B
	Meso- límbicas	5	PBP (0,6 mm)	-	<b>AcbC</b> , LSS
		6	PBP (0,6 mm)	-	AcbC
		7	PBP (0,48 mm; <b>Figura 24 A</b> )	DA	<b>Tu</b> , VP, AAV
		8	PBP (0,36 mm)	-	<b>AcbC</b> , CPu, SI, BSTLP (todas las dianas eran contralaterales)
		9	PBP (0,36 mm)	-	CPu (ventrolateral), IPAC, CeC, B
		10	PN (0,36 mm)	-	<b>Tu</b> , Pir, VP, AAV, ACo, PBP, PN, CLi
		11	PN (0,36 mm)	-	Tu, AOM, BSTMPL, LPO
		12	PN (0,24 mm; <b>Figura 24 D</b> )	DA	AcbC, BSTL, LS, LH
		13	PN (0,24 mm)	-	LSV
		14	PN (0,24 mm)	DA	Tu, ICj, VP, LH
		15	rVTA (0,6 mm)	-	AcbSh (lateral), CPu (ventral)
		16	rVTA (0,6 mm)	DA	AcbSh (lateral), CPu (dorsocaudal)
	Meso- estriadas	17	PBP (0,6 mm; <b>Figura 25 A</b> )	-	<b>CPu</b> , LSS
		18	rVTA (0,6 mm)		<b>CPu</b> (dorsal), LSS
NEURONAS DE PROYECCIÓN AL PROSENCEFALO Y AL TRONCO DEL ENCÉFALO	19	PBP (0,72 mm)	-	MDL, LH (ipsilateral), LPAG, PVG, RRF, PBP, SNC, DpMe (ipsilateral), Dk, RI, <b>IO</b> (bilateral) (El resto de dianas eran contralaterales)	
	20	PBP (0,72 mm; <b>Figura 26 A</b> )	-	PVG, PCom, DpMe, LPAG	
	21	PBP (0,6 mm)	-	HDB, BSTMA, <b>LH</b> , LPO, MPA, ZI, PBP, rVTA, IF, PN (contralateral), IP (contralateral), PTg, DTg, <b>PMnR</b> , PnV	
	22	PBP (0,6 mm)	-	SI, <b>BM</b> , BSTLI, LH, RM, PBP, IF, DpMe	
	23	PBP (0,48 mm)		PSTh, SI, LPAG, PBP, RRF	
	24	PBP (0,36 mm)	-	SI, B, Me, CeM, BSTMPL, Rt, <b>LH</b> , ML, LPO, LDTg	
	25	PBP (0,36 mm)	-	<b>PH</b> , LPAG, PBP, rVTA, SNC, LDTg	
	26	PBP (0,36 mm)	-	<b>HDB</b> , SI, BSTMPI, PH, ZI, PVG, PBP, LDTg, RtTg	
	27	rVTA (0,6 mm)	-	<b>E/OV</b> , <b>LS</b> , AcbC, BSTMPL, PV, Re, Rh, Sub, MHb, AH, LH, DR	
	28	rVTA (0,6 mm)	-	HDB, VDB, LSI, PVA, Rt, MCPO, PH, ZI, <b>LDTg</b>	
	29	rVTA (0,36 mm)	-	HDB, RM, DMPAG	
	30	VTT*(0,36 mm)	-	<b>LSI</b> , PV, LPO, LH, <b>LPAG</b> (bilateral), PPT, OT, RtTg	

Las estructuras en las que el axón de cada neurona proporciona una colateralización terminal más densa que en el resto de estructuras, según se ha estimado por observación visual cualitativa, aparecen en negrita. DA: dopamina; N: número de la neurona; NT: neurotransmisor. Véase la Lista de Abreviaturas.

\* El soma de esta neurona se ubicó en una zona pobre en TH justo posterior a PN, llamada VTT por Ikemoto (2007). Esta región no representa lo que actualmente se identifica como tVTA/RMTg (Barrot y cols., 2012; Yelnikoff y cols., 2014).

#### 4.4 COMPARACIÓN DE LA LONGITUD DE AXÓN DE LOS CAMPOS TERMINALES PROPORCIONADOS POR DIFERENTES TIPOS DE NEURONAS DEL VTA

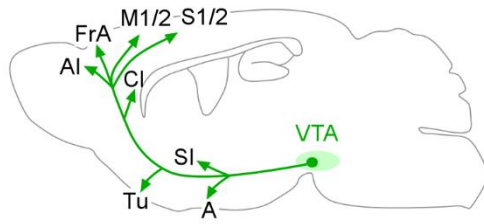
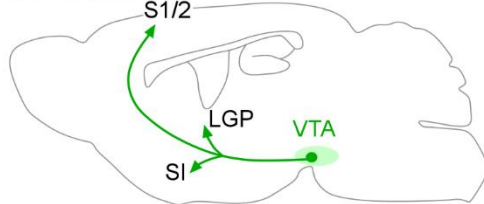
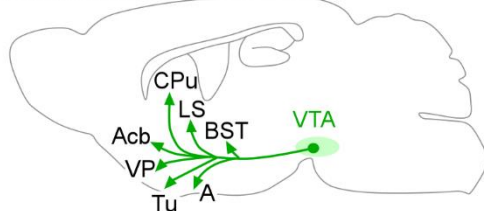
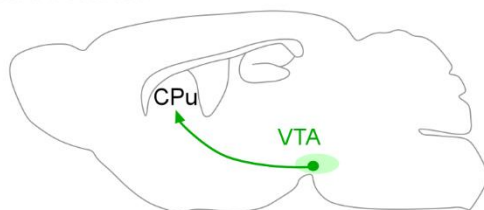
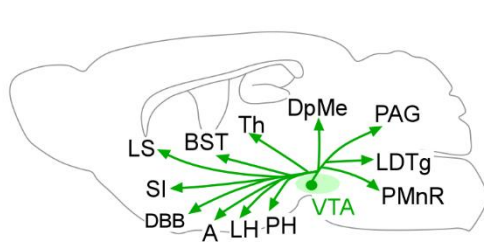
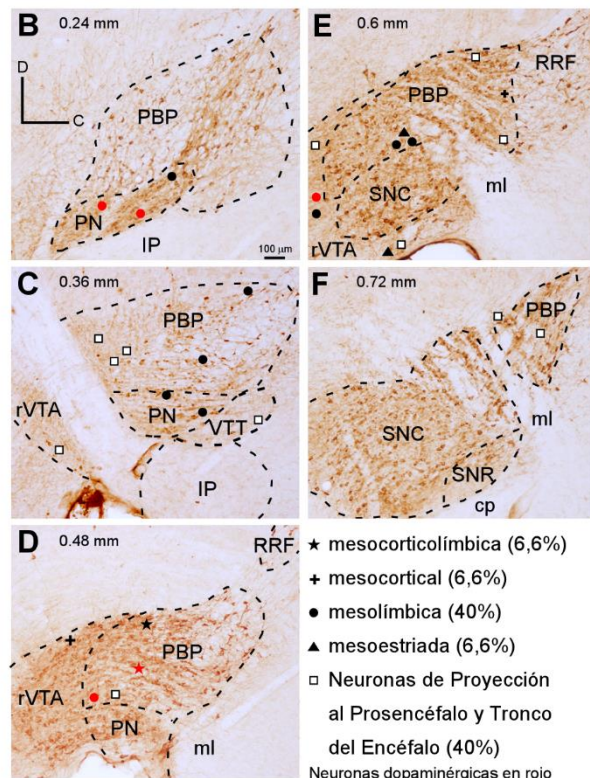
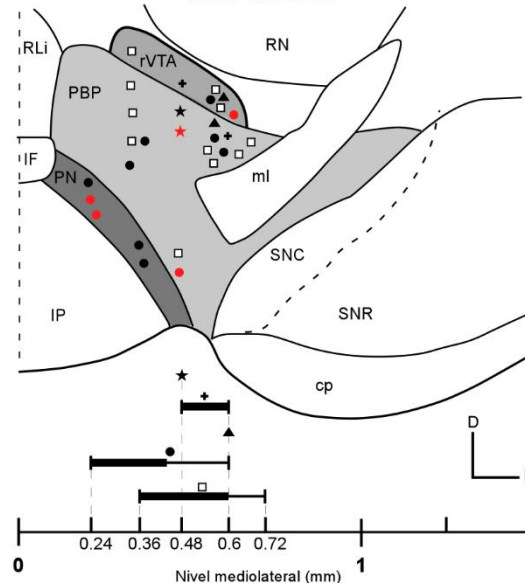
En la **Tabla 10** se muestra la longitud de axón presente en los campos terminales proporcionados en las principales estructuras inervadas por las neuronas mesocorticolímbicas, mesolímbicas y mesoestriadas del VTA. La mayor longitud de axón de un campo terminal se encontró en el sector dorsal del caudado-putamen (229,82 mm) y fue proporcionado por una neurona mesoestriada ubicada en la región lateral de PBP (0,6 mm lateral a la línea media). Los campos terminales observados en el tubérculo olfatorio también fueron bastante densos aunque la longitud de axón estimada fue mucho menor que en caudado-putamen y varió considerablemente dependiendo del tipo de neurona que originaba el campo. Así, la longitud de axón del campo terminal en el tubérculo olfatorio proporcionado por una neurona mesolímbica fue de 86,82 mm, que es más del doble de la longitud de axón proporcionada en esa misma estructura por una neurona mesocorticolímbica (31,92 mm). Ambas neuronas con proyección al tubérculo olfatorio estaban situadas en la misma subdivisión del VTA, el PBP, y concretamente en su sector más medial, lo que sugiere que la longitud de axón de los campos terminales proporcionados por neuronas del VTA en una estructura determinada varía dependiendo del patrón de arborización axonal que posea la neurona y no parece relacionarse con la localización del soma celular en una subdivisión concreta del VTA. Lógicamente, esta idea debe comprobarse realizando un estudio más exhaustivo que compare la longitud de axón de los campos terminales con el tipo neuronal según su ramificación axonal y según su ubicación territorial dentro del VTA. En las neuronas mesocorticolímbicas la longitud de las fibras terminales emitidas en la corteza cerebral (68,31 mm) fue el doble que la proporcionada en el tubérculo olfatorio (31,92 mm). Por último, las longitudes de las fibras terminales en el núcleo septal lateral, en la división lateral del núcleo del lecho de la estría terminal y en el núcleo accumbens inervados por las colaterales axónicas de una misma neurona mesolímbicas fueron pequeñas, oscilando entre 7,2 mm en la región *core* del núcleo accumbens y 10,70 mm en el núcleo septal lateral.

En cuanto a la longitud de axón obtenida a partir de la suma de la longitud de axón de los campos terminales proporcionados por una sola neurona, el mayor valor fue de 229,82 mm y pertenecía a una neurona mesoestriada. Esta longitud de axón es el doble de la longitud de axón de las neuronas mesocorticolímbicas (112,22 mm) y es muy superior al de las neuronas mesolímbicas (92,96 o 25,46 mm). Cabe señalar también que se ha observado una notable diferencia en la longitud de axón total proporcionado entre dos neuronas del mismo tipo (mesolímbicas) una con 92,96 mm y la otra con 25,46 mm.

**Tabla 10.** Longitud de axón de los campos terminales marcados a partir de neuronas individuales del VTA

TIPO NEURONAL (Subdivisión del VTA; Fig. en la que se ilustra)	ESTRUCTURA INERVADA	LONGITUD DE AXÓN (mm)	CE
<b>Mesocorticolímbica</b> (sector medial PBP; <b>Figura 22 D)</b>	M2/FrA	68.31	0.102
	Tu	31.92	0.103
	AStr	11.99	0.121
<b>Mesolímbica</b> (sector medial PBP; <b>Figura 24 A)</b>	Tu	86.82	0.095
	VP	6.14	0.094
<b>Mesolímbica</b> (PN; <b>Figura 24 D)</b>	LS	10.70	0.121
	BSTL	7.56	0.151
	AcbC	7.2	0.083
<b>Mesoestriada</b> (sector lateral PBP; <b>Figura 25 A)</b>	CPu	229.82	0.104

CE, coeficiente de error. Para otras abreviaturas véase la Lista de Abreviaturas.

**A Neuronas de Proyección al Prosencéfalo****Mesocorticolímbicas****Mesocorticales****Mesolímbicas****Mesoestriadas****Neuronas de Proyección al Prosencéfalo y al Tronco del Encéfalo****Vista Sagital****G****Vista Coronal**

**Figura 28. Tipos de neuronas de proyección del VTA y su localización topográfica.** A: dibujos que muestran las principales estructuras inervadas por los diferentes tipos de neuronas de proyección al prosencéfalo (mesocorticolímbicas, mesocorticales, mesolímbicas, mesoestriadas) y neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo. Obsérvese que para cada tipo de neurona los dibujos representan las principales estructuras inervadas por la suma de todas las neuronas de ese tipo que han sido reconstruidas en este estudio. B-G: localización de los somas de varios tipos de neuronas ubicadas en PBP, PN, rVTA y VTT en secciones sagitales (B-F) y en una coronal (G). Las líneas negras de la parte inferior son más gruesas en los niveles en los que un tipo determinado de neurona es especialmente abundante.

L: lateral; Th: tálamo. Para el resto de abreviaturas véase la Lista de Abreviaturas.

## **DISCUSIÓN**

---

Este estudio se diseñó con el objetivo de analizar desde el punto de vista anatómico la diversidad de las neuronas de proyección del VTA en ratones y determinar si las subdivisiones citoarquitectónicas del VTA presentan proyecciones eferentes específicas, lo cual permanece prácticamente inexplorado y su conocimiento es necesario para comprender mejor las características funcionales de los territorios mesencefálicos que componen el VTA. Para lograr estos objetivos, en primer lugar nos propusimos abordar el estudio de las proyecciones eferentes de pequeñas poblaciones celulares ubicadas en una sola subdivisión del VTA y, posteriormente, analizar los patrones de arborización de neuronas individuales distribuidas en varias subdivisiones del VTA. El primer estudio lo realizamos examinando las estructuras cerebrales que contenían campos axonales terminales marcados a partir de pequeños depósitos del trazador anterógrado BDA ubicados en una sola subdivisión del VTA. Este análisis demostró que poblaciones reducidas de neuronas localizadas en las subdivisiones PBP o PN de VTA proyectaban a numerosas regiones prosencefálicas, corticales y subcorticales, y troncoencefálicas. Estos hallazgos podían ser interpretados como que estas subdivisiones del VTA están pobladas por distintos tipos de neuronas de proyección, estrechamente entremezclados, y cada tipo proyecta a una o varias estructuras neurales y, en conjunto, todos ellos inervan amplios territorios cerebrales. O bien, estas observaciones podían entenderse como que las neuronas de proyección de estas subdivisiones del VTA poseen axones con un patrón de arborización muy ramificado que les permite inervar amplias regiones cerebrales simultáneamente. Para determinar cuál de estas dos interpretaciones era válida, y así determinar si los patrones de campos axonales teñidos con el BDA reflejaban la morfología axonal de células individuales o una mezcla de diferentes tipos celulares, realizamos la tinción de neuronas individuales situadas en PBP, PN, rVTA y VTT, y reconstruimos su arborización axonal completa. En este estudio de célula única, además, abordamos el análisis del fenotipo neuroquímico de las neuronas reconstruidas mediante el análisis a nivel de microscopía confocal de su expresión de la TH para determinar si eran dopaminérgicas. Los hallazgos de este estudio a nivel de célula única indicaron que las neuronas del VTA, al igual que las neuronas de otras regiones del mesencéfalo ventral (Prensa and Parent, 2001; Cebrián and Prensa, 2005, 2010), poseen axones ramificados, si bien el grado de ramificación varía entre las neuronas. Nuestros resultados han demostrado que las

subdivisiones de VTA analizadas en este estudio contienen dos tipos principales de neuronas de proyección: (1) neuronas de proyección al prosencéfalo, cuyo axón principal sigue una trayectoria rostral para inervar estructuras corticales y/o del prosencéfalo basal, y (2) neuronas de proyección al prosencéfalo y hacia el tronco del encéfalo, cuyo axón principal se ramifica abundantemente en la proximidad del soma celular. Además, dentro del primer tipo neuronal se pueden distinguir cuatro subtipos distintos de neuronas de proyección según sean sus dianas principales de innervación: 1a. mesocorticolímbicas (proyectan a la corteza cerebral y al prosencéfalo basal), 1b. mesocorticales (inervan casi exclusivamente a la corteza cerebral), 1c. mesolímbicas (inervan estructuras límbicas del prosencéfalo basal), y 1d. mesoestriadas (inervan intensamente el caudado-putamen). Nuestros resultados también demostraron que el neurotransmisor dopamina está presente en algunas neuronas de proyección al prosencéfalo.

## **5.1 CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS**

### **5.1.1 Subdivisiones del VTA**

Tal y como se ha mencionado previamente, la región del VTA incluye distintos núcleos o subdivisiones que varían según los autores. Así, en el atlas de Franklin y Paxinos (2007), esta región engloba las subdivisiones PBP, PN, rVTA y PIF. Este último núcleo es una región situada ventral a PBP, rostral a PN y caudal al fascículo retrorreflejo que se extiende desde 0,24 a 0,48 mm lateral a la línea media (Franklin y Paxinos, 2007; Fu y cols., 2012). El rVTA ocupa la región rostradorsal del VTA (Fu y cols., 2012), y es una región rica en neuronas glutamatérgicas (Yamaguchi y cols., 2011; Gorelova y cols., 2012). El autor Ikemoto (2007) distinguió 4 subdivisiones dentro de VTA: PBP, PN, área parafascicular retrorrefleja y VTT. El área parafascicular retrorrefleja englobaría rVTA y la región rostral del PIF, y es una zona pobre en neuronas dopaminérgicas que se continua con los somas TH+ del área hipotalámica posterior. El VTT se sitúa posterior a PN y lateral a la mitad posterior del IP y la densidad de somas de neuronas TH+ es claramente menor que la de PN y la de PBP. Según la delimitación realizada por Ikemoto

(2007), esta región no coincide con lo que actualmente se considera la cola del VTA (tVTA) o el núcleo tegmental rostromedial (RMTg), que es la principal estructura gabaérgica inhibidora de los sistemas dopaminérgicos mesencefálicos (Jhou y cols., 2009; Barrot y cols., 2012; Bourdy y Barrot, 2012; Bourdy y cols., 2014; Yetnikoff y cols., 2014). De acuerdo con algunos autores, los núcleos de la línea media denominados interfascicular, rostral linear y caudal linear no pertenecen al VTA (Swanson, 1982; Halliday y Törk, 1986; Ikemoto, 2007; Yamaguchi y cols., 2011). Sin embargo, otros investigadores han incluido estos núcleos dentro del grupo A10 (Del-Fava y cols., 2007; Fu y cols., 2012), a pesar de que contienen neuronas dopaminérgicas con características que son distintas de aquellas localizadas más lateralmente. Fu y colaboradores (2012) observaron que estos núcleos de la línea media contenían más neuronas dopaminérgicas calbindina positivas, y menos DAT positivas o GIRK2 (*G-protein-regulated inward-rectifier potassium channel 2*) positivas, lo que se relaciona con una menor vulnerabilidad a la degeneración en la enfermedad de Parkinson que el resto de grupos celulares del VTA. Además, los cuerpos celulares de las neuronas del núcleo interfascicular son más pequeños que los de las otras subdivisiones del VTA (Halliday y Törk, 1986; Fu y cols., 2012). Anatómicamente, el núcleo rostral linear se distingue del resto de subdivisiones del VTA por ser el que menor densidad de neuronas dopaminérgicas presenta y porque sus proyecciones eferentes se dirigen principalmente a la parte ventrolateral del pálido ventral, tubérculo olfatorio y estructuras diencefálicas (núcleo talámico mediodorsal y parte lateral de la habénula) e inerva escasamente el núcleo accumbens y otras regiones telencefálicas ricas en TH (Del-Fava y cols., 2007).

En este estudio hemos analizado las principales subdivisiones, clásicamente consideradas como tales, del VTA: el PBP y el PN, ricos en neuronas dopaminérgicas. Además, hemos incluido otras dos regiones mucho menos exploradas en la literatura y con menor contenido en células dopaminérgicas, como son el rVTA, que es una región definida con claridad en el atlas de Franklin y Paxinos (2007) y más recientemente por Fu y colaboradores (2012), y el VTT, que ha sido delimitado con detalle por Ikemoto (2007).



### 5.1.2 Visualización del fenotipo dopaminérgico de las neuronas infectadas por el vector Sindbis-pal-GFP

El vector Sindbis-pal-GFP es muy eficaz para la visualización de la arborización axonal completa de neuronas únicas debido a que promueve la síntesis masiva de la proteína GFP una vez que el RNA codificante ha entrado en la célula (Kuramoto y cols., 2009; Matsuda y cols., 2009; Porrero y cols., 2016). En nuestro estudio hemos analizado la expresión de la proteína TH en las 30 neuronas del VTA que fueron marcadas con este vector con el fin de determinar si se trataba de neuronas dopaminérgicas. Los resultados obtenidos de este análisis fueron que de las 30 neuronas marcadas con este vector solamente en 5 pudimos demostrar que expresaban la TH. Este bajo número de neuronas TH+ infectadas nos pareció bastante sorprendente puesto que el 62% de las neuronas de VTA son dopaminérgicas (Nair-Roberts y cols., 2008) y, además, las neuronas infectadas estaban dispersas entre numerosas células TH+ (véase la **Figura 12**) por lo que era de esperar obtener un mayor número de neuronas dopaminérgicas infectadas con el pseudovirión. Estos resultados nos llevaron a pensar que el pseudovirión pudiera tener algún tipo de incompatibilidad con células dopaminérgicas y que por lo tanto infectase preferentemente a neuronas no dopaminérgicas; si bien, no encontramos en la bibliografía ningún dato referente a esta posibilidad. Otra hipótesis que nos resultaba más plausible es que hubiera algo que impidiese visualizar la expresión de TH en muchas de las neuronas del VTA infectadas por el vector viral Sindbis-pal-GFP. Esta hipótesis se vio reforzada cuando realizamos una inyección del trazador anterógrado tetrametilrodamina en VTA y encontramos que de las 24 neuronas teñidas por el trazador, 12 mostraron inmunorreactividad para la TH, lo que apoyó nuestra sospecha de que muchas de las neuronas del VTA infectadas por el vector viral Sindbis-pal-GFP fueran dopaminérgicas aunque no se pudiera visualizar su contenido en TH. Una posible explicación de la baja tasa de neuronas TH+ infectadas por este vector es que al producirse la infección por el pseudovirión se inhibe la síntesis de proteínas por parte de la célula huésped (Bredenbeek, 1993) por lo que ésta no puede sintetizar nueva TH. La inhibición de la síntesis de proteínas se debe a la sobreproducción de la proteína GFP, dirigida por un fuerte promotor subgenómico del pseudovirión Sindbis-pal-GFP, que consume masivamente los recursos de energía y nutrientes de las neuronas

infectadas impidiendo la síntesis de otras proteínas, como la TH (Jeromin y cols., 2003). Teniendo presente que la vida media de la TH es de 30 horas (Tank y cols., 1986), las células infectadas cuyo contenido de TH pudimos visualizar con inmunofluorescencia podrían corresponder a neuronas que todavía mantuvieran un nivel de TH suficiente porque hubieran sido infectadas más tarde, gracias a la capacidad del pseudovirión de permanecer en el espacio extracelular un periodo de tiempo indeterminado antes de entrar en la neurona. Una vez aclarada la posible explicación de la ausencia de la TH en las neuronas infectadas, decidimos acortar el tiempo de supervivencia de los animales tras la inyección intracerebral de los vectores. De esta forma, pasamos de esperar 56 horas desde la inyección a 48 horas, con el objetivo de favorecer la visualización de la TH en las neuronas infectadas asegurando al mismo tiempo un buen marcaje de todo el árbol axonal, para su posterior reconstrucción. Aunque no existe en la literatura ninguna mención a la posible interferencia que los pseudoviriones Sindbis-pal-GFP pudieran ejercer en la síntesis de proteínas celulares, queremos destacar que en el estudio de la vía nigroestriada de la rata realizada por el grupo de Matsuda y colaboradores (2009) empleando este mismo vector viral, sólo 21 (30%) de las 70 neuronas de la SNC infectadas pudieron demostrar que eran inmunopositivas frente a la TH, lo que representa también una tasa sorprendentemente baja de neuronas dopaminérgicas, teniendo en cuenta que se trata de una estructura donde la mayoría de neuronas son dopaminérgicas. En este estudio de Matsuda y colaboradores (2009) emplearon un tiempo de supervivencia ligeramente más corto (36-42 horas) que el usado en nuestro trabajo.

En las neuronas en las que no pudimos demostrar la expresión de la TH (es decir, en las que fueron TH-), no realizamos experimentos adicionales con técnicas de inmunohistoquímica o de hibridación *in situ* para averiguar si expresaban marcadores de neuronas gabaérgicas, como la enzima descarboxilasa del ácido glutámico, o de neuronas glutamatérgicas, como el transportador vesicular de glutamato, debido a que teníamos que asegurarnos de que no se perdiese ni rompiese ninguna sección del encéfalo de ratón para poder reconstruir los axones. Tras la inmunohistoquímica frente a la TH y el análisis de confocal las secciones ya estaban bastante frágiles y someterlas a nuevas tinciones hubiese supuesto perder el material para la reconstrucción de los

axones de las neuronas infectadas, lo cual exige contar con cada una de las secciones adyacentes del encéfalo para no perder ningún segmento del axón.

## **5.2 PROYECCIONES EFERENTES DEL VTA**

En este apartado discutiremos las proyecciones eferentes de las subdivisiones PBP, PN, rVTA y VTT descritas en el presente estudio a la luz de los datos existentes en la literatura.

### **5.2.1 Proyecciones a la corteza cerebral**

Numerosos estudios han descrito una extensa innervación cortical procedente del VTA (Beckstead y cols., 1979; Swanson, 1982; Oades y Halliday, 1987; Carr y Sesack, 2000; Hosp y cols., 2011, 2013, 2015). Nuestro trabajo confirma una vez más esta proyección hacia la corteza cerebral y además pone de manifiesto la existencia de una amplia innervación cortical a partir de neuronas de PBP cuyos axones alcanzan las cortezas somatosensorial, motora, límbica (retroesplenial, cingular, entorrinal), prefrontal (prelímica) y de asociación (frontal, orbitaria). Dentro de las cortezas somatosensorial y motora, en áreas primarias y secundarias, se observaron terminales axonales teñidas que provenían de inyecciones en PBP, lo cual es un hallazgo en el roedor que se asemeja a descripciones realizadas en gatos y primates que indican que el mesencéfalo ventral innervaba las áreas motoras 4 y 6 (Reinoso Suárez y Llamas, 1968; Williams y Goldman-Rakic, 1998). En las reconstrucciones de neuronas únicas de PBP, hemos observado que hay neuronas que proyectan a las cortezas primarias motora y somatosensorial, pero no a las secundarias, mientras otras neuronas innervan los territorios secundarios de ambas cortezas y no los primarios. Aunque es necesario ampliar el número de reconstrucciones axonales de neuronas de VTA que innervan la corteza para llegar a resultados concluyentes sobre este aspecto, estas observaciones podrían indicar que existen poblaciones de neuronas segregadas con proyecciones específicas a estos territorios primarios y secundarios motores y somatosensoriales. Nuestro estudio además ha demostrado que existen neuronas dopaminérgicas que innervan las cortezas primarias motora y somatosensorial. La selectividad que algunas

neuronas de PBP muestran para innervar territorios corticales sensorimotores primarios o secundarios, refuerza la idea de que existe una especificidad funcional de la innervación dopaminérgica de las cortezas motoras primaria y secundaria, siendo la corteza motora primaria necesaria para el aprendizaje de habilidades motoras (Hosp y cols., 2011), y la corteza motora secundaria para la evaluación y selección de acciones motoras voluntarias dirigidas ("*driven by*") por la recompensa esperada y por el error de predicción de la recompensa que es transmitido por neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Schultz, 1998; Sul y cols., 2011).

En nuestro estudio se observaron terminales axonales en la corteza prefrontal de la corteza prefrontal procedentes sólo de inyecciones localizadas en PBP, pero no de inyecciones ubicadas en PN. Sin embargo, diversos autores han descrito proyecciones dopaminérgicas de las neuronas de PN a la región medial de la corteza prefrontal de roedores y primates (Albanese y Minciacchi, 1983; Deutch y cols., 1991; Williams y Goldman-Rakic, 1998; Carr y Sesack, 2000; Lammel y cols., 2008). La corteza entorrinal recibe innervación tanto de PBP como de PN aunque la intensidad de innervación proporcionada por PN es notablemente mayor que la de PBP, lo que sugiere que existe cierta preferencia de las subdivisiones de VTA por innervar determinadas estructuras cerebrales, como previamente han defendido otros autores (Swanson, 1982; Scheibner y Törk, 1987). De acuerdo con nuestros resultados, es probable que PBP proyecte a la corteza cerebral más abundantemente que PN ya que se ha visto un gran número de territorios corticales marcados a partir de depósitos de BDA ubicados en PBP, siendo este número significativamente mayor que el obtenido a partir de los depósitos de BDA en PN. Además de las nueve neuronas de PBP, cuyos axones se dirigieron hacia el prosencéfalo, tres proporcionaron innervación cortical mientras que de los cinco axones reconstruidos de neuronas de PN que se dirigían al prosencéfalo, ninguno innervó a la corteza cerebral.

### **5.2.2 Proyecciones a la amígdala, hipocampo, núcleos septales y banda diagonal de Broca**

La amígdala extendida (núcleo amigdalino central, medial y núcleo del lecho de la estría terminal) es otra diana de innervación de neuronas del VTA bien documentada (Ungerstedt, 1971; Beckstead y cols., 1979; Swanson, 1982; Oades y Halliday, 1987; Laviolette y Grace, 2006; Aransay y cols., 2015). Estas proyecciones del VTA son principalmente dopaminérgicas aunque también se han descrito proyecciones eferentes gabaérgicas al núcleo central de la amígdala (Taylor y cols., 2014). Nuestro trabajo proporciona información novedosa respecto a la selectividad de varias subdivisiones del VTA para innervar núcleos amigdalinos específicos. Así, PBP proyecta a los núcleos amigdalinos central, medial y basolateral, mientras que en nuestro estudio no hemos visto que PN inerve dichos núcleos aunque sí el núcleo amigdalino cortical. Sin embargo, otras regiones como el área amigdalina anterior y el núcleo del lecho de la estría terminal son innervadas por neuronas ubicadas tanto en PBP como en PN. También hemos podido demostrar en este estudio la naturaleza dopaminérgica de las proyecciones de PBP a la parte anterior del núcleo amigdalino basolateral y a los núcleos amigdalinos central y medial y desde PN al núcleo del lecho de la estría terminal. Las terminales dopaminérgicas del núcleo del lecho de la estría terminal participan en la predicción de la recompensa y en los mecanismos de adicción a drogas de abuso (Eiler y cols., 2003; Krawczyk y cols., 2011). El trabajo de Taylor y colaboradores (2014) en ratones demuestra que la amígdala y el núcleo del lecho de la estría terminal reciben también proyecciones gabaérgicas y glutamatérgicas desde el VTA. Además han observado neuronas del VTA que pueden coliberar glutamato y dopamina en estas dos estructuras. Taylor y colaboradores (2014) también han localizado proyecciones gabaérgicas del VTA al brazo posterior de la banda diagonal de Broca.

Todas las subdivisiones del VTA analizadas en este trabajo innervaron el núcleo septal lateral, y PN proporcionó específicamente proyecciones dopaminérgicas a este núcleo. El núcleo septal lateral media la respuesta tanto a estímulos de recompensa como de estrés (Sotomayor y cols., 2005) y forma parte de un circuito que conecta el hipocampo dorsal y el VTA relacionado con asociaciones contexto-recompensa (Luo y

cols., 2011). La banda diagonal fue innervada por PBP, PN y rVTA mientras que el hipocampo sólo recibió innervación de neuronas de PN cuyos axones alcanzaron el subículo. En nuestro estudio no hemos podido observar proyecciones del VTA a otras estructuras del hipocampo como el estrato *oriens* de CA1 y CA3, que son estructuras cuya innervación por VTA está bien documentada (Swanson, 1982; Yetnikoff y cols., 2014), y posiblemente sea debido a que las neuronas de origen de estas proyecciones han quedado fuera de las inyecciones pequeñas de BDA que hemos realizado y de las neuronas cuyos axones han sido reconstruidos.

### 5.2.3 Proyecciones al estriado ventral y dorsal

En nuestro estudio hemos descrito proyecciones desde PBP y PN al tubérculo olfatorio, a las regiones *shell* y *core* del núcleo accumbens y al pálido ventral. Estas estructuras a su vez envían proyecciones al VTA que son importantes para los comportamientos relacionados con la recompensa (Zahm y cols., 2001; Geisler y Zahm, 2005; Geisler y cols., 2007; Ikemoto, 2007; Sesack y Grace, 2010; Tripathi y cols., 2010, 2013). El núcleo accumbens es una región crítica donde los aspectos motivacionales interaccionan con el circuito motor para seleccionar el comportamiento apropiado dirigido a la consecución de objetivos (*goal-directed behavior*) (Mogenson y cols., 1980; Groenewegen y cols., 1996; Nicola y cols., 2000; Zahm, 2000; Wise, 2004). La integración de las numerosas proyecciones aferentes al núcleo accumbens, desde estructuras como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal, está modulada por la innervación dopaminérgica del VTA (Sesack y Grace, 2010). El VTA a su vez recibe numerosas proyecciones aferentes (véase el apartado 1.4 de Introducción) que posicionan al sistema dopaminérgico para poder influenciar en el *goal directed behavior* en base a los impulsos internos y a las contingencias ambientales. Las acciones que resultan en recompensa provocan la liberación de dopamina fásica de las neuronas del VTA, lo que sirve para mantener en curso el comportamiento mediante la potenciación selectiva de los impulsos del subículo al accumbens. Sin embargo los comportamientos que fracasan en producir una recompensa esperada, disminuyen la transmisión de dopamina, lo que favorece que los impulsos de la corteza prefrontal cambien a nuevas estrategias de comportamiento (Sesack y Grace, 2010). El sistema de recompensa está diseñado para

optimizar los planes de acción de forma que se consiga la mayor recompensa. Este sistema puede ser alterado por drogas de abuso y trastornos psiquiátricos provocando comportamientos inapropiados que mantienen estrategias de recompensa fallidas (Sesack y Grace, 2010). Diversos estudios han demostrado que la proyección dopaminérgica desde el VTA al núcleo accumbens contribuye a la recompensa asociada con las drogas de abuso (Wise, 2004; Ikemoto, 2007), y la plasticidad en este sistema está fuertemente implicada en las adicción a drogas que conlleva una búsqueda compulsiva de la droga (Wolf y cols 2004; Zweifel y cols, 2008).

En nuestro estudio hemos profundizado en el conocimiento de las proyecciones desde el VTA al núcleo accumbens observando que las neuronas que inervan la región *core* del accumbens son abundantes en PN y también se encuentran distribuidas por toda la extensión mediolateral de PBP. Además, al menos en el grupo de neuronas que hemos analizado, ninguna de las neuronas que inervan la región *core* del accumbens proyecta al pálido ventral y al tubérculo olfatorio; siendo estas dos últimas estructuras del prosencéfalo basal inervadas por neuronas que predominan en PN y en la región medial de PBP. Además, el fenotipo de las neuronas de VTA que inervan estas tres estructuras del prosencéfalo basal es probablemente diferente ya que mientras la región *core* del accumbens recibe más dopamina que GABA y glutamato desde VTA, el patrón opuesto se observa en el tubérculo olfatorio y en el pálido ventral (Hnasko y cols., 2012; Taylor y cols., 2014). Aunque VTA está inervada por muchas neuronas del pálido ventral (Tripathi y cols., 2013) es probable que las proyecciones recíprocas entre ambas estructuras sean escasas, ya que solamente 4 de las 30 neuronas reconstruidas en nuestro estudio inervaron el pálido ventral. Además los axones que inervan el pálido ventral también se arborizan en el tubérculo olfatorio, y proporcionan campos terminales que tienen una longitud de axón mucho mayor en el tubérculo olfatorio (86,82 mm) que en el pálido ventral (6,14 mm; **Tabla 10**).

Dada la similitud que existe en las proyecciones eferentes del *tier* dorsal de la SNC y la región lateral de PBP (Haber y Fudge, 1997; Prensa y Parent, 2001), era de esperar encontrar inervación en el sector dorsal del caudado-putamen procedente de neuronas situadas lateralmente en el PBP, tal y como hemos descrito en este estudio, pero, además, hemos encontrado que en esta proyección al estriado dorsal también

participan neuronas ubicadas en el rVTA. Los campos terminales localizados en el caudado-putamen procedentes de neuronas de la porción lateral del PBP han sido los de mayor longitud de axón, siendo esta longitud muy superior a la estimada en el resto de estructuras neurales inervadas por otras neuronas del VTA. La inervación masiva del caudado-putamen observada en este estudio es muy semejante a la descrita por Matsuda y colaboradores (2009) en la vía nigroestriada en la rata usando el mismo vector viral Sindbis-pal-GFP.

#### **5.2.4 Proyecciones al tálamo y al epitálamo**

Las proyecciones desde el VTA al núcleo habenular lateral y al tálamo medial son bien conocidas (Beckstead y cols., 1979; Swanson, 1982; Albanese y Minciacchi, 1983; Skagerberg y cols., 1984; Oades y Halliday, 1987; Domesick, 1988; Aransay y cols., 2015). La habénula lateral es un núcleo clave regulador del circuito de recompensa del mesencéfalo. Mientras que las neuronas dopaminérgicas del VTA son excitadas por estímulos que producen recompensa e inhibidas por la omisión de ésta, las neuronas de la habénula lateral muestran respuestas contrarias, de tal forma que son inhibidas por señales que predicen recompensa y activadas por la omisión de ésta (Matsumoto y Hikosaka, 2007). La habénula lateral expresa estados de aversión y recompensa negativa (retirar temporalmente una recompensa, algo positivo, cuando una persona actúa de forma incorrecta) a través de una potente inhibición indirecta de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Stamatakis, 2013). Esta inhibición indirecta se realiza a través del núcleo tegmental rostromedial (RMTg), el cual recibe proyecciones glutamatérgicas de la habénula lateral y a su vez este núcleo tegmental proporciona una potente inervación gabaérgica sobre las neuronas dopaminérgicas del VTA. Se ha observado que tanto la activación de neuronas del VTA que proyectan a la habénula (Lammel y cols., 2012) como la activación de las terminales glutamatérgicas de la habénula lateral en el núcleo tegmental rostromedial producen aversión y promueven un comportamiento que busca evitar la activación del circuito habénula lateral- núcleo tegmental rostromedial (Stamatakis y Stuber, 2012).



De las proyecciones del VTA a la habénula lateral se ha estimado que entre el 30-50% son dopaminérgicas (Gruber y cols., 2007). Sin embargo, se ha demostrado que la activación de estas neuronas del VTA que proyectan a la habénula lateral y que muestran marcadores dopaminérgicos producen inhibición de las neuronas de la habénula lateral, debido a la liberación de GABA a nivel sináptico, lo que produce la desinhibición de las neuronas dopaminérgicas del VTA, a través del circuito habénula lateral-núcleo tegmental rostromedial-VTA, para promover comportamientos relacionados con la recompensa (Stamatakis, 2013). Por lo tanto se cree que los estados de recompensa producen impulsos inhibitorios desde VTA a la habénula lateral mediante estas neuronas híbridas (dopaminérgicas-gabaérgicas) para actuar suprimiendo las eferencias de la habénula lateral sobre el núcleo tegmental rostromedial. Otras terminales del VTA en el núcleo habenuar lateral liberan glutamato (Hnasko y cols., 2012), lo que puede producir también la inhibición indirecta de las neuronas dopaminérgicas del VTA mediante la activación de neuronas inhibitorias del núcleo tegmental mesopontino rostromedial (Hong y cols., 2011). Stamatakis y colaboradores (2013) señalaron que las neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectaban a la habénula lateral no proporcionaban colaterales al núcleo accumbens, al núcleo basolateral de la amígdala, a la corteza prefrontal, ni al núcleo del lecho de la estría terminal. En nuestro estudio no hemos visualizado ninguna neurona del VTA que proyecte al núcleo habenuar lateral, por lo que queda sin conocer el tipo de arborización axonal implicado en estas importantes funciones reguladoras de las acciones motivadas por la recompensa, ni la distribución regional de las neuronas que participan en este circuito, y se requerirán nuevos estudios a nivel de célula única para investigar estas importantes cuestiones.

El tálamo recibe proyecciones de neuronas del PBP, PN y rVTA, aunque éstas solamente proporcionan una innervación escasa que se concentra en los núcleos anteriores (anteromedial), de la línea media (paraventricular, romboidal y reuniens), submedio, central medial, mediodorsal y reticular (Rt). No se ha observado ninguna preferencia por parte de ninguna de las subdivisiones del VTA analizadas en este trabajo para innervar núcleos talámicos específicos.

### 5.2.5 Proyecciones al hipotálamo y a la sustancia gris periacueductal

Las áreas hipotalámicas anterior, lateral y posterior, el área supraóptica y el núcleo mamilar medial reciben proyecciones directas desde las neuronas del VTA, tal y como hemos demostrado en este estudio. Se sabe que el área hipotalámica lateral recibe una densa innervación dopaminérgica y gabaérgica desde el VTA (Taylor y cols., 2014) y a su vez inerva neuronas dopaminérgicas del VTA involucradas en la codificación del valor de recompensa (Watabe-Uchida y cols., 2012). Esta región hipotalámica es una diana común de las subdivisiones del VTA que hemos analizado y las neuronas de PN son una de sus fuentes de dopamina (Aransay y cols., 2015).

Las subdivisiones PBP, PN, rVTA y VTT del VTA también inervan la sustancia gris periacueductal, principalmente su región lateral, y al menos algunas neuronas de PBP le proporcionan dopamina, tal y como hemos demostrado aquí. La sustancia gris periacueductal desempeña un importante papel en la regulación de comportamientos defensivos, la función autonómica y la nocicepción (Lovick, 1993; Bandler y Shipley, 1994; Behbehani, 1995). En nuestro estudio observamos que la innervación de la sustancia gris periacueductal es especialmente abundante y bilateral desde la VTT, subdivisión del VTA que contiene muchas neuronas de proyección gabaérgicas, lo que apoya la idea propuesta por Kirouac y colaboradores (2004). Estos autores analizaron detalladamente las proyecciones desde el VTA y la sustancia negra a la región ventrolateral de la sustancia gris periacueductal en la rata, concluyendo que la mayoría de estas proyecciones eran gabaérgicas. Kirouac y Pittman (2000) mostraron que la estimulación de la región ocupada por el VTA y la sustancia negra producía una respuesta cardiovascular depresora mediada por las proyecciones a la PAG y el núcleo dorsal del rafe. Según Kirouac y Pittman (2000) un porcentaje de las neuronas del VTA (32%), de la SNC (9%), y de la SNR (38%) que proyectan a la región ventrolateral de la PAG y núcleo dorsal del rafe, contienen GAD (enzima involucrada en la síntesis de GABA). Se cree que la respuesta cardiovascular depresora se debe a la activación de las proyecciones desde la región ventrolateral de la sustancia gris periacueductal a las regiones ventromedial y ventrolateral del bulbo raquídeo (Lovick, 1993; Bandler y

Shiple, 1994; Behbehani, 1995; Bandler y cols., 2000) que a su vez proyectan sobre las neuronas simpáticas preganglionares de la columna intermediolateral de la médula espinal, produciéndose una vasodilatación debido a la inhibición de estas neuronas preganglionares simpáticas (Dampney, 1994; Sun, 1995). Kirouac y colaboradores (2004) también defendieron que la activación de las neuronas gabaérgicas de la región de VTA y la sustancia negra que proyectan a la región ventrolateral de la PAG produce antinocicepción, es decir, reduce la sensibilidad al dolor, aunque los mecanismos por los que se produce este efecto no se conocen. Sí se sabe que GABA es un importante regulador de los mecanismos de modulación del dolor en la región ventromedial de la PAG (Reichling y Basbaum, 1990; Williams y Beitz, 1990; Osborne y cols., 1996; Roychowdhury y Fields, 1996; Hall y Behbehani, 1998). Además, numerosos estudios demuestran que la región del VTA y sustancia negra recibe información nociceptiva (Barasi, 1979; Tsai y cols., 1980; Tsai, 1989; Ma y cols., 1993; Gao y cols., 1996; Smith y cols., 1997; Ohtori y cols., 2000), sugiriendo que el dolor puede activar un circuito neuronal en VTA/sustancia negra que en respuesta module la transmisión del dolor. También es posible que la región de VTA/sustancia negra module los mecanismos neuronales en la PAG involucrados en la producción de respuestas autonómicas y comportamentales relacionados con el dolor y el estrés (Lovick, 1993; Bandler y Shipley, 1994; Behbehani, 1995; Bandler y cols., 2000; Kirouac y Pittman, 2000). Una explicación al hecho de que la activación de las proyecciones gabaérgicas de VTA y de la sustancia negra a la región ventrolateral de la PAG produzca antinocicepción está en la “hipótesis de la analgesia por desinhibición de GABA” (*the GABA disinhibition hypothesis of analgesia*), que consiste en la supresión de los impulsos inhibitorios gabaérgicos sobre las neuronas que constituyen la vía analgésica descendente, la cual se origina en la PAG e inerva a la región rostral ventromedial del bulbo y, desde aquí, al asta dorsal de la médula espinal (Lau y Vaughan, 2014). La activación de este sistema descendente produce analgesia por la inhibición de la transmisión nociceptiva a nivel de la médula espinal (Basbaum y Fields, 1984). De acuerdo con la “hipótesis de la analgesia por desinhibición de GABA”, en la PAG y en la región rostral ventromedial del bulbo, existen interneuronas gabaérgicas tónicamente activas, las cuales liberan GABA y actúan vía receptor GABA<sub>A</sub> sobre las neuronas que proyectan a la médula espinal (Basbaum y Fields, 1984). Se cree que los opioides y cannabinoides (Meng y cols., 1998) activan esta

vía descendente moduladora del dolor, que surge desde la PAG- región rostral ventromedial del bulbo hasta la médula espinal, mediante la inhibición de las interneuronas gabaérgicas, lo cual produce desinhibición del sistema antinociceptivos descendente (Lau y Vaughan, 2014). Por lo tanto al igual que los opioides y los cannabinoides inhiben las interneuronas gabaérgicas de la PAG produciendo analgesia, la activación de las proyecciones gabaérgicas desde VTA a la PAG, también pueden inhibir a las interneuronas gabaérgicas de la PAG desencadenando antinocicepción.

### **5.2.6 Proyecciones al tronco del encéfalo**

Estudios previos han demostrado la existencia de proyecciones axonales locales dentro del VTA en roedores, las cuales pueden mediar las interacciones entre sus neuronas (Adell y Artigas, 2004; Ferreira y cols., 2008). Después de marcar neuronas del PBP en nuestro estudio hemos observado abundantes terminales axonales dentro del VTA, las cuales proporcionan inervación al mismo PBP y, de forma menos frecuente, también al PN, rVTA, al núcleo interfascicular y al núcleo interpeduncular. Estos datos difieren parcialmente con los hallazgos descritos por Ferreira y colaboradores (2008) en ratas según los cuales PBP proporciona inervación a sí mismo pero no a la región caudomedial del VTA en la que se incluye PN. En nuestro trabajo hemos encontrado menos frecuentemente inervación local en el VTA después de inyectar en PN, aunque también se encontraron algunas terminales axonales distribuidas por PN, PBP, rVTA y el núcleo linear caudal.

Nuestro estudio ha mostrado proyecciones a la porción compacta de la sustancia negra y al campo retrorrubral que se originan exclusivamente de neuronas del PBP, a diferencia de lo que se ha descrito en ratas en las que hay inervación de estos territorios mesencefálicos tanto desde la región caudomedial del VTA (que incluye a los núcleos interfascicular, caudal linear y PN) como desde el PBP, aunque desde la región caudomedial en menor medida (Ferreira y cols., 2008). Estas diferencias pueden deberse a diferencias entre especies, y/o al pequeño tamaño muestral y también a que el PN no inerve la porción compacta de la sustancia negra ni el campo retrorrubral pero si lo haga

el núcleo interfascicular o el caudal linear que son los otros componentes de la región caudomedial del VTA.

En estudios anatómicos previos, se ha observado que las fibras descendentes que se originan en el PBP y PN alcanzan la mitad medial del tegmento mesencefálico incluyendo la región anterior del núcleo mediano del rafe, descienden también al núcleo dorsal del rafe, al núcleo parabraquial, al *locus coeruleus* (Beckstead y cols., 1979) y al núcleo tegmental laterodorsal (Cornwall y cols., 1990). En nuestro estudio hemos observado innervación desde PBP, PN y rVTA al núcleo tegmental laterodorsal y desde PBP y PN al núcleo tegmental dorsal. Además desde PBP destacan las proyecciones al núcleo mesencefálico profundo y a la parte oral del núcleo reticular pontino. Desde PN destaca la innervación a núcleos pontinos y núcleo dorsal del rafe.

El núcleo olivar inferior fue innervado también por neuronas del PBP en nuestro estudio y trabajos previos habían descrito que está innervado por el núcleo rostral linear (Del-Fava y cols., 2007).

### 5.3 DIVERSIDAD DE NEURONAS DE PROYECCIÓN DEL VTA

Nuestros hallazgos han puesto de manifiesto por primera vez que en el VTA coexisten dos tipos morfológicos de neuronas de proyección definidos por la trayectoria y el patrón de arborización de sus axones. El primer tipo son neuronas cuyos axones se dirigen rostralmente para ramificarse en estructuras del prosencéfalo, mientras que el segundo tipo engloba neuronas cuyos axones se ramifican en la proximidad del cuerpo celular y alcanzan estructuras del prosencéfalo basal y del tronco del encéfalo. En nuestra muestra, las neuronas que proyectan al prosencéfalo representaron el 60% y las que innervan el prosencéfalo basal y el tronco del encéfalo el 40%. Dentro del primer tipo neuronal, y atendiendo a las dianas de innervación, se pueden distinguir cuatro subtipos: 1a. neuronas mesocorticolímbicas, que proyectan a la corteza cerebral y al prosencéfalo basal; 1b. neuronas mesocorticales que innervan casi exclusivamente la corteza cerebral; 1c. neuronas mesolímbicas, que innervan estructuras límbicas del prosencéfalo basal y 1d. neuronas mesoestriadas, cuyos axones innervan profusamente el caudado-putamen.

En nuestra muestra, la proporción relativa de los cuatro tipos de neuronas prosencefálicas fue similar para las neuronas mesocorticolímbicas, mesocorticales y mesoestriatales, todas ellas representaron un 6,6%, mientras que las mesolímbicas fueron más abundantes, llegando a representar el 40%.

Los resultados de este estudio muestran por primera vez a nivel de neurona individual que existen dos sistemas de proyección segregados, el mesocortical y el mesolímbico, compuesto el primero por axones de neuronas de tipo mesocortical y el segundo por axones de neuronas de tipo mesolímbico. Además, existe otro sistema diferente de los dos anteriores, el sistema mesocorticolímbico, constituido por los axones de neuronas del VTA que inervan simultáneamente la corteza cerebral y estructuras límbicas subcorticales.

Con respecto a la distribución topográfica de los tipos morfológicos de neuronas de proyección descritos en este trabajo es importante destacar que ninguno de ellos se distribuye de una manera que se correlacione con alguna de las cuatro subdivisiones del VTA analizadas aquí (**Figura 28 B-G**). Si bien es cierto que, en concordancia con lo descrito en investigaciones previas (Berger y cols., 1976; Lindvall y cols., 1978; Simon y cols., 1979; Fallon, 1981; Swanson, 1982; Albanese y Minciacchi, 1983; Tzschentke, 2001), hemos observado que las neuronas del VTA que inervan la corteza cerebral (mesocorticales o mesocorticolímbicas) se concentran mayoritariamente en la subdivisión PBP, mientras que en PN abundan las neuronas cuyos axones inervan territorios límbicos subcorticales. El análisis de la disposición topográfica de los varios tipos de células analizadas aquí permite sugerir que las neuronas del VTA mesolímbicas, mesocorticolímbicas, mesocorticales y mesoestriadas pudieran distribuirse siguiendo una secuencia mediolateral, mientras que las neuronas de VTA de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo se distribuyeran ampliamente en toda la extensión medio-lateral del VTA (**Figura 28 G**). Las neuronas mesolímbicas fueron abundantes en el PBP, PN y rVTA, y el 66% de ellas se concentraron desde la línea media hasta unos 0,48 mm en sentido lateral. Las neuronas mesocorticolímbicas se confinaron al sector medial del PBP (nivel mediolateral 0,48 mm aproximadamente; **Figura 28 D, G**), una región que contiene muchas células que proyectan a la corteza prefrontal medial (Lammel y cols., 2008). Las neuronas mesocorticales y mesoestriadas se ubicaron en el

rVTA y PBP; las primeras desde un nivel de 0,48 hasta 0,6 mm y las últimas a 0,6 mm de la línea media. Las neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo se extendieron desde 0,36 hasta 0,72 mm lateral a la línea media, con el 50% de ellas localizadas medialmente a 0,6 mm dentro del PBP, rVTA y el VTT. Las restantes se situaron en el sector lateral del PBP y rVTA.

### 5.3.1 Neuronas de proyección al prosencéfalo

Nuestro estudio describe por primera vez neuronas de VTA del tipo mesocorticolímbico, algunas de las cuales hemos podido demostrar que son dopaminérgicas, cuyos axones se ramifican para alcanzar amplios territorios de la corteza cerebral y del prosencéfalo basal. Este hallazgo indica que, al menos en ratones, varias estructuras corticales y del prosencéfalo basal puedan recibir señales dopaminérgicas simultáneas emitidas por una única neurona del VTA. Los axones principales de estas neuronas mesocorticolímbicas tienden a evitar atravesar el caudado-putamen, siguiendo una trayectoria que bordea ventralmente esta estructura, y luego inervan el claustró antes de continuar hacia la corteza cerebral para inervar las cortezas frontal de asociación, motora primaria, somatosensorial primaria, la insular agranular dorsal y la cingular. Entre las regiones del prosencéfalo basal más inervadas por estos axones están estructuras olfatorias, la amígdala y el pálido ventral, entre otras. Tal y como hemos descrito en este trabajo, la longitud de axón de los campos terminales que proporcionan estas neuronas en la corteza cerebral dobla a la que proporcionan en el tubérculo olfatorio, y es unas seis veces mayor que la del área de transición amigdaloestriada. Debido a su amplia colateralización axonal para inervar dianas del prosencéfalo, las neuronas mesocorticolímbicas podrían actuar como un nodo integrador de territorios corticales y límbicos que son a su vez inervados por proyecciones mesocorticales y mesolímbicas segregadas. De especial interés es el hecho de que existan células mesocorticolímbicas dopaminérgicas que alcancen tanto la corteza prefrontal como la parte anterior del núcleo amigdalino basolateral, ya que las conexiones entre el VTA y estas dos estructuras han sido implicadas en los mecanismos patogénicos de la esquizofrenia en humanos (Laviolette, 2007). El sistema mesocorticolímbico aparece gravemente alterado en pacientes esquizofrénicos y podría

ser responsable de las alteraciones que presentan en el procesamiento y control emocional y motivacional, en el aprendizaje y en la memoria, que son funciones en las que participan la corteza prefrontal, el núcleo basolateral de la amígdala, el núcleo accumbens y el VTA (Laviolette, 2007). Son conocidas las proyecciones dopaminérgicas desde el VTA al núcleo accumbens, corteza prefrontal y amígdala basolateral (Simon y cols., 1979, Laviolette, 2007), así como las proyecciones excitatorias, probablemente glutamatérgicas, desde la amígdala al núcleo accumbens y a la corteza prefrontal (Laviolette, 2007). Según Laviolette (2007) el núcleo accumbens actuaría como un generador de respuesta comportamental basándose en la convergencia de la información que recibe de tipo emocional, procedente del núcleo basolateral de la amígdala, la información asociativa, procedente de la corteza prefrontal, la información contextual aportada por el hipocampo y la información emocional que proporciona el VTA. Estudios de neuroimagen en humanos e investigaciones en animales de experimentación señalan que las conexiones entre la amígdala y la corteza prefrontal, las cuales estarían afectadas en la esquizofrenia, tiene un papel crucial en el procesamiento emocional. Laviolette (2007) propuso un modelo hipotético que explicaría el procesamiento emocional aberrante así como la alteración en la memoria en pacientes esquizofrénicos. Según este modelo existiría una disregulación de las aferencias dopaminérgicas desde el VTA al circuito de procesamiento emocional formado por las conexiones entre la amígdala basolateral y la corteza prefrontal lo que produciría una anormal amplificación y distorsión de la información sensorial y emocional, alterando el procesamiento emocional, aprendizaje y memoria. Se produciría un aumento de señal dopaminérgica en la corteza prefrontal, que inhibiría a una subpoblación de neuronas dentro de la corteza prefrontal, las cuales en condiciones normales inhiben neuronas de la amígdala que intervienen en el procesamiento emocional (Rosenkranz y Grace, 2002; Milad y cols., 2004). Además, la hiperactividad dopaminérgica de VTA que produce una activación de las proyecciones desde la amígdala basolateral a la corteza prefrontal reforzaría las asociaciones condicionadas que son transferidas a una subpoblación de la corteza prefrontal encargada de codificar la memoria emocional. El comportamiento final determinado por mecanismos integrantes del núcleo accumbens reflejaría este procesamiento emocional y motivacional patológico procedente de las aferencias desde VTA a la amígdala



basolateral y a la corteza prefrontal, dando lugar a comportamientos aberrantes y respuestas inapropiadas a la información emocional.

Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, la subdivisión que puede tener más importancia en la fisiopatología de la esquizofrenia es PBP medial, puesto que inerva la corteza prefrontal, cuya hipoactividad está implicada en los síntomas cognitivos de la esquizofrenia, e inerva estructuras corticales (corteza prefrontal ventrolateral) y subcorticales (estriado ventral) en las que se ha observado un descenso de la actividad dopaminérgica en relación con la aparición de síntomas negativos (apatía, anhedonia, aislamiento social). Además, PBP medial también inerva regiones límbicas (núcleo accumbens, amígdala) en las que se ha observado un aumento de dopamina que se correlaciona con la aparición de síntomas positivos (alucinaciones, ideas delirantes) (Goghari y cols., 2010). Según la teoría de la disfunción dopaminérgica en la esquizofrenia propuesta por Sesack y Carr (2002), existiría una hipoactividad de la corteza prefrontal, que inerva a neuronas dopaminérgicas y gabaérgicas del VTA. La corteza prefrontal inerva neuronas dopaminérgicas mesoprefrontales del VTA y neuronas no dopaminérgicas, principalmente gabaérgicas, que proyectan al núcleo accumbens (Carr y Sesack, 2000). En la esquizofrenia la hipofunción de la corteza prefrontal hace que disminuya la actividad excitadora de la corteza prefrontal sobre las neuronas dopaminérgicas mesoprefrontales del VTA provocando un descenso de la transmisión de dopamina a nivel cortical lo que conlleva un deterioro aún mayor de la función de la corteza prefrontal, exacerbando los síntomas negativos de la enfermedad (Sesack y Carr 2002) (**Figura 29**) Esta hipótesis se corrobora con el hallazgo en cerebros esquizofrénicos postmortem de una reducción de la densidad de fibras mesoprefrontales dopaminérgicas (Akil y cols., 1999). La corteza prefrontal inerva neuronas gabaérgicas del VTA que a su vez inervan el núcleo accumbens y a otras neuronas dopaminérgicas mesoaccumbales del VTA. Al disminuir la actividad de la corteza prefrontal, disminuirá la actividad inhibitoria de estas neuronas gabaérgicas, aumentando la cantidad de dopamina en el núcleo accumbens y explicando así la aparición de síntomas positivos.

Además de en la esquizofrenia, la red de conexiones dopaminérgicas que establece el VTA con estructuras límbicas subcorticales y corticales también juega un

papel importante en la enfermedad de Parkinson. Los pacientes parkinsonianos tratados con agonistas dopaminérgicos para compensar su déficit de dopamina en el sistema motor presentan una mayor susceptibilidad para sufrir alteraciones en el control de impulsos, registrándose hasta en un 14% de ellos conductas adictivas patológicas como ludopatía, hipersexualidad o compras compulsivas (Evans y cols., 2009; Reyes y cols., 2013). Esta mayor susceptibilidad de los pacientes con Parkinson para sufrir alteraciones del control de impulsos puede explicarse por la desigual degeneración del sistema dopaminérgico en la enfermedad de Parkinson, la cual afecta preferentemente a las neuronas dopaminérgicas de la SNC, especialmente las del tier ventral, mientras que las neuronas dopaminérgicas de la SNC dorsomedial y del VTA suelen preservarse (Damier y cols., 1999). La parte ventral de la SNC proyecta a la región dorsolateral del CPu y participa en funciones motoras que son las principalmente afectadas en el Parkinson. Sin embargo, la región medial de la SNC y el VTA, que se han denominado conjuntamente la región del control de impulsos del mesencéfalo (Reyes y cols., 2013) e inervan preferentemente regiones límbicas como el estriado ventral, son preservadas en la enfermedad de Parkinson. Se postula que durante la terapia con agonistas dopaminérgicos en pacientes con Parkinson, las neuronas dopaminérgicas de esta región pueden ser sobrestimuladas, afectando a todo el sistema mesocorticolímbico, aumentando así la probabilidad de desarrollar alteraciones en el control de impulsos y, por lo tanto, conductas adictivas (Cools, 2006; Reyes y cols., 2013). En este sentido, un estudio relativamente reciente ha demostrado que tienen una activación disfuncional de los autorreceptores dopaminérgicos (D2, D3) del mesencéfalo y un bajo tono dopaminérgico en núcleo accumbens, produciéndose una alteración de la homeostasis de la dopamina a nivel cortical y estriatal que explica la vulnerabilidad a presentar alteración del control de impulsos (Ray y cols., 2012).

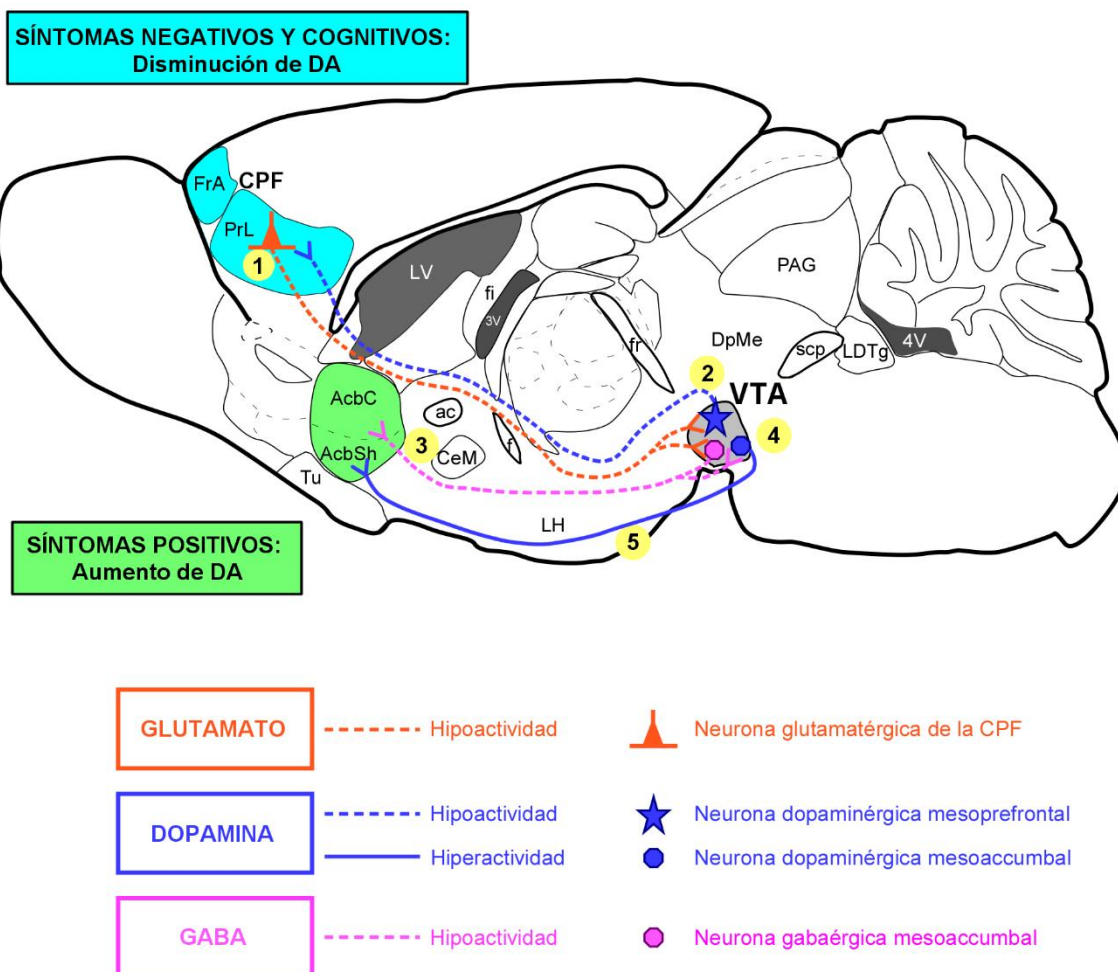
Las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo expresan los receptores dopaminérgicos D1 y D5, que pertenecen a la familia de receptores excitatorios *D1-like* (activan neuronas postsinápticas), y los tipos D2 y D3, que pertenecen a la familia de autorreceptores inhibitorios *D2-like* (inhiben la neurona postsináptica y a ellas mismas) y parecen mediar los trastornos de control de impulsos (Kelley y cols, 2012; Reyes y cols., 2013). Además, estas neuronas expresan los transportadores de dopamina (DAT) y el

vesicular de dopamina (VMAT) (Shimada y cols., 1992; Cerruti y cols., 1993; Gonzalez-Hernandez y cols., 2004; Afonso-Oramas y cols., 2009; Reyes y cols., 2013). El hecho de que las neuronas de la SNC medial y el VTA expresen menos DAT que las de otras regiones sugiere que poseen una menor capacidad para la recaptación de dopamina y, por lo tanto, pueden conservar una mayor cantidad de dopamina extracelular ante un estímulo que conlleva la liberación de este neurotransmisor (Reyes y cols., 2013). Dada la extensa ramificación axónica de las neuronas del VTA demostrada en esta Tesis Doctoral, la cual alcanza su máxima expresión en las de tipo mesocorticolímbico, los efectos de una sobreestimulación de estas neuronas mediales del mesencéfalo pueden afectar a múltiples regiones cerebrales simultáneamente, concretamente al núcleo accumbens y a regiones límbicas de la corteza cerebral, y favorecer la aparición de trastornos adictivos en los enfermos parkinsonianos.

Las neuronas mesocorticales inervan la corteza cerebral de forma más focalizada que las neuronas mesocorticolímbicas y sus terminales se restringen a territorios somatosensoriales. Otra característica que distingue a las neuronas mesocorticolímbicas de las mesocorticales es que los axones principales de las últimas atraviesan el caudado-putamen diagonalmente dejando una colateral en el globo pálido lateral. Es relevante el hecho de que ninguna de las neuronas que inervaron la corteza cerebral, proporcionaron inervación en el núcleo accumbens, lo que apoya la idea de la existencia de dos sistemas, el mesocortical y el mesoaccumbal, funcionalmente diferentes (Sesack y Carr, 2002; Björklund y Dunnett, 2007). Las neuronas del VTA que inervan el núcleo accumbens, tanto su región *core* como la *shell*, mostraron una inervación predominante de esta estructura, siendo incluso la única diana de algunas neuronas (**Tabla 9**), lo que sugiere que el VTA pueda ejercer un control bastante selectivo y potente sobre los sistemas estriado-palidales ventrales, semejante al control ejercido por la SNC sobre el caudado-putamen. Sin embargo, a diferencia del sistema nigroestriado, que es principalmente dopaminérgico, las neuronas de proyección de VTA al núcleo accumbens pueden también liberar GABA o glutamato (Yamaguchi y cols., 2011; Taylor y cols., 2014), además de poder coliberar dopamina con glutamato (Stuber y cols., 2010).

### 5.3.2 Neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo

Este tipo de neuronas de proyección ha supuesto el 40% de nuestra muestra experimental y en ninguna de ellas se pudo demostrar que fuese dopaminérgica. Nuestras observaciones apuntan a que estas neuronas son abundantes en la región rostral y caudal de VTA, y sus axones se ramifican profusamente en la proximidad del soma para inervar sutilmente numerosas estructuras neurales, pero evitando aquellas del prosencéfalo basal y de la corteza cerebral que son inervadas por otros tipos de neuronas de VTA. El patrón de arborización axonal de este tipo de neuronas es atípico cuando se compara con los de los otros tipos de neuronas de VTA, pero se asemeja bastante a la arborización de las neuronas que componen la formación reticular y esta semejanza se refuerza con el hecho de que estas neuronas inervan estructuras estrechamente relacionadas con esta formación troncoencefálica. La mayoría de estas células inervaron el núcleo hipotalámico posterior o la región del área hipotalámica lateral- área preóptica, la cual, excepto por algunos *boutons en passage* de algunos axones mesolímbicos procedentes de PN, no reciben inervación de ningún otro tipo neuronal de VTA. Asimismo, el brazo horizontal de la banda diagonal de Broca, la zona incerta (ZI) y los núcleos talámicos de la línea media han sido inervados exclusivamente por este tipo de neuronas. Respecto a las estructuras del tronco del encéfalo, la sustancia gris periacueductal lateral y el núcleo tegmental laterodorsal, fueron las más frecuentemente inervadas. El núcleo tegmental laterodorsal es un controlador de la actividad de las neuronas dopaminérgicas de VTA (Lodge y Grace, 2006) y el principal “driver” de las neuronas dopaminérgicas de PBP que inervan el sector lateral de la región *shell* del accumbens, favoreciendo la recompensa (Lammel y cols., 2012). Los axones de dos neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo ubicadas en PBP enviaron colaterales tanto al núcleo tegmental laterodorsal como a PBP, lo que sugiere que puedan desempeñar un papel regulador intrínseco de VTA sobre el sistema mesencefálico dopaminérgico con proyección al núcleo accumbens.



**Figura 29. Representación esquemática de la teoría de la disfunción dopaminérgica en la esquizofrenia.**

**1:** en la esquizofrenia existe una hipoactividad de las neuronas glutamatérgicas de la CPF que proyectan sobre neuronas dopaminérgicas mesoprefrontales y gabaérgicas mesoaccumbales del VTA. **2:** al estar menos activadas las neuronas dopaminérgicas mesoprefrontales proporcionan menos dopamina (DA) a la CPF, provocando un deterioro aún mayor de la función de la CPF y exacerbando los síntomas negativos y cognitivos de la enfermedad. **3:** al disminuir la actividad de la CPF, decrece la actividad inhibitoria de las neuronas gabaérgicas mesoaccumbales que inervan el núcleo accumbens y **(4)** neuronas dopaminérgicas mesoaccumbales del VTA. **5:** las neuronas dopaminérgicas mesoaccumbales del VTA al estar menos inhibidas proporcionan mayor cantidad de dopamina al núcleo accumbens, explicando así la aparición de síntomas positivos. Modificada de Sesack y Carr (2002). Véase la Lista de Abreviaturas.

## **CONCLUSIONES**

---

1. El VTA comprende varias subdivisiones con características hodológicas particulares. Las subdivisiones PBP y PN del ratón inervan de manera selectiva y con intensidades variables estructuras prosencefálicas (corticales y subcorticales) y troncoencefálicas. Ambas subdivisiones proporcionan diferentes intensidades de inervación en las estructuras que son dianas comunes para ambas.
2. Las subdivisiones PBP y PN tienen como dianas comunes la corteza piriforme, el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio, el pálido ventral, la habénula lateral, el hipotálamo lateral, el núcleo tegmental laterodorsal y el núcleo reticular pontino. Ambas subdivisiones inervan el complejo amigdalino pero mientras PBP proyecta preferentemente al núcleo central de la amígdala, el PN lo hace al núcleo cortical. Otras estructuras son inervadas exclusivamente por una de las dos subdivisiones como el caudado-putamen que es inervado por PBP o el subículo del hipocampo que es inervado por PN.
3. El patrón de proyecciones eferentes de PBP indica que es un componente fundamental de los sistemas de proyección mesocortical -inervando ampliamente la corteza cerebral- y mesolímbico, mientras que PN lo es del sistema mesolímbico. Tanto PBP como PN inervan de manera intensa la región shell del núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio, sugiriendo que ambas subdivisiones de VTA puedan ejercer un control potente y selectivo sobre los sistemas estriado-palidales ventrales, semejante al control ejercido por la sustancia negra compacta sobre el caudado-putamen.
4. Atendiendo a sus patrones de arborización axonal se distinguen dos tipos principales de neuronas de proyección en las subdivisiones PBP, PN, rVTA y VTT del VTA: 1. las neuronas de proyección al prosencéfalo y 2. las neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo.
5. Las neuronas de proyección al prosencéfalo incluyen cuatro subtipos según sus principales dianas de inervación: neuronas mesocorticolímbicas, que proyectan a la corteza cerebral y al prosencéfalo basal; neuronas mesocorticales, que inervan la corteza cerebral; neuronas mesolímbicas, que inervan estructuras límbicas del

- prosencéfalo; y neuronas mesoestriadas, que inervan de manera casi exclusiva el caudado-putamen.
6. No se ha podido demostrar una localización topográfica selectiva de ninguno de estos tipos de neuronas de proyección en las subdivisiones del VTA analizadas en este estudio.
  7. La reconstrucción de axones individuales ha demostrado por primera vez que existen sistemas mesocortical y mesolímbico segregados, y diferentes del sistema mesocorticolímbico. Las neuronas mesocorticolímbicas, algunas de ellas de naturaleza dopaminérgica, podrían actuar como un nodo integrador de territorios corticales y límbicos que son a su vez inervados por proyecciones mesocorticales y mesolímbicas segregadas.
  8. El VTA inerva la corteza cerebral mediante dos tipos de neuronas de proyección: mesocorticales y mesocorticolímbicas. Las neuronas mesocorticales proyectan a la corteza cerebral de forma más focalizada, inervando casi exclusivamente territorios somatosensoriales, mientras que las mesocorticolímbicas inervan amplias regiones de la corteza cerebral (frontal de asociación, límbicas, motoras primaria y secundaria y somatosensorial secundaria).
  9. El patrón de arborización axonal de las neuronas de proyección al prosencéfalo y al tronco del encéfalo es muy diferente al del resto de neuronas del VTA, asemejándose al de las neuronas de la formación reticular por su extensa ramificación en la proximidad del soma celular.
  10. La longitud de axón de los campos terminales que proporcionan neuronas del VTA en una estructura determinada varía en función del patrón de arborización axonal que posean las neuronas y no parece relacionarse con la ubicación de éstas en una subdivisión u otra del VTA. La longitud de axón que proporciona una misma neurona en sus distintas dianas es muy variable, especialmente en las neuronas de VTA con axones muy ramificados como las mesocorticolímbicas.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Achim K, Peltopuro P, Lahti L, Li J, Salminen M, Partanen J (2012). Distinct developmental origins and regulatory mechanisms for GABAergic neurons associated with dopaminergic nuclei in the ventral mesodiencephalic region. *Development* 139(13): 2360-70.
- Adell A, Artigas F (2004). The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev* 4: 415–431.
- Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Alvarez de la Rosa D, Abreu P, Giráldez T, Castro-Hernández J, Salas-Hernández J, Lanciego JL, Rodríguez M, González-Hernández T (2009). Dopamine transporter glycosylation correlates with the vulnerability of midbrain dopaminergic cells in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 36 (3): 494–508.
- Akagi K, Powell EW (1968) Differential projections of habenular nuclei. *J Comp Neur* 132: 263 -74.
- Akil M, Pierri JN, Whitehead RE, Edgar CL, Mohila C, Sampson AR, Lewis DA (1999). Lamina-specific alterations in the dopamine innervation of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects. *Am J Psychiatry* 156: 1580-9.
- Albanese A, Bentivoglio M (1982). The organization of dopaminergic and non-dopaminergic mesencephalo-cortical neurons in the rat. *Brain Res* 238(2): 421-5.
- Albanese A, Minciacchi D (1983). Organization of the ascending projections from the ventral tegmental area: a multiple fluorescent retrograde tracer study in the rat. *J Comp Neurol* 216: 406–20.
- Andén NE, Dahlström A, Fuxe K, Larsson K, Olson L, Ungerstedt U (1966). Ascending monoamine neurons to the telencephalon. *Acta physiol scand* 67: 313-326.
- Aransay A, Rodríguez-López C, García-Amado M, Clascá F, Prensa L (2015). Long-range projection neurons of the mouse ventral tegmental area: a single-cell axon tracing analysis. *Front Neuroanat* 9: 59.
- Arbuthnott GW, Mitchell MJ, Tulloch IF, Wright AK (1976). Efferent pathways from lateral hypothalamic neurones [proceedings]. *J Physiol* 263(1): 131P-132P.
- Arias-Carrión O, Stamelou M, Murillo-Rodríguez E, Menéndez-González M, Pöppel E (2010). Dopaminergic reward system: a short integrative review. *International Archives of Medicine* 3: 24.
- Arenas E, Denham M, Villaescusa JC (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development* 142(11): 1918-36.
- Barrot M, Sesack SR, Georges F, Pistis M, Hong S, and Jhou TC (2012). Braking dopamine systems: a new GABA master structure for mesolimbic and nigrostriatal functions. *J Neurosci* 32: 14094–101.
- Bandler R, Shipley MT (1994). Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci* 17(9): 379-89.

- Bandler R, Keay KA, Floyd N, Price J (2000). Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res Bull* 53: 95–104.
- Barasi S (1979). Responses of substantia nigra neurones to noxious stimulation. *Brain Res* 171: 121–30.
- Bariselli S, Glangetas C, Tzanoulinou S, Bellone C (2016). Ventral tegmental area subcircuits process rewarding and aversive experiences. *J Neurochem* 139(6): 1071–80.
- Barker DJ, Root DH, Zhang S, Morales M (2016). Multiplexed neurochemical signaling by neurons of the ventral tegmental area. *J Chem Neuroanat* 73:33–42.
- Basbaum AI, Fields HL (1984). Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 7: 309–38.
- Bayer VE, Pickel VM (1991). GABA-labeled terminals form proportionally more synapses with dopaminergic neurons containing low densities of tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in rat ventral tegmental area. *Brain Res* 559(1): 44–55.
- Beckstead RM (1979). An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *J Comp Neurol* 184(1): 43–62.
- Beckstead RM, Domesick VB, Nauta WJ (1979). Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res* 175(2):191–217.
- Behbehani MM (1995). Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 46(6): 575–605.
- Beier KT, Steinberg EE, DeLoach KE, Xie S, Miyamichi K, Schwarz L, Gao XJ, Kremer EJ, Malenka RC, Luo L (2015) Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell* 162: 622–34.
- Berger B, Thierry AM, Tassin JP, Moyne MA (1976). Dopaminergic innervation of the rat prefrontal cortex: a fluorescence histochemical study. *Brain Res* 106(1):133–45.
- Berridge KC, Robinson TE (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Rev* 28(3): 309–369.
- Björklund A, Dunnett SB (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30 (5):194–202.
- Blaess S, Ang SL (2015). Genetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4(2):113–34.
- Bredenbeek PJ, Frolov I, Rice CM, Schlesinger S (1993). Sindbis virus expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs. *J Virol* 67:6439–46.
- Bocklisch C, Pascoli V, Wong JCY, House DRC, Yvon C, de Roo M, Tan KR, Luscher C (2013). Cocaine disinhibits dopamine neurons by potentiation of GABA transmission in the ventral tegmental area. *Science* 341: 1521–25.
- Bodian D (1940). Studies on the diencephalon of the Virginia opossum. Part II. The fiber connections in normal and experimental material. *J Comp Neurol* 72: 207–97.

- Bourdy R, Barrot M (2012). A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail. *Trends Neurosci* 35: 681–90.
- Bourdy R, Sánchez-Catalán MJ, Kaufling J, Balcita-Pedicino JJ, Freund-Mercier MJ, Veinante P, Sesack SR, Georges F, Barrot M (2014). Control of the Nigrostriatal Dopamine Neuron Activity and Motor Function by the Tail of the Ventral Tegmental Area. *Neuropsychopharmacology* 39 (12): 2788-98.
- Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS (1993). The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol* 338(2): 255-78.
- Brown MTC, Tan KR, O'Connor EC, Nikonenko I, Muller D, Luscher C (2012). Ventral tegmental area GABA projections pause accumbal cholinergic interneurons to enhance associative learning. *Nature* 492: 452–56.
- Callaway EM (2008). Transneuronal circuit tracing with neurotropic viruses. *Curr Opin Neurobiol* 18(6): 617-23.
- Castaldi L (1923). Studi sulla struttura e sullo sviluppo del mesencefalo. I ricerche in Cavia cobaya. *Arch Ital Anat Embriol* 20: 23-225.
- Carr DB, Sesack SR (2000). GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* 38: 114–123.
- Cebrián C, Parent A, Prensa L (2005). Patterns of axonal branching of neurons of the substantia nigra pars reticulata and pars lateralis in the rat. *J Comp Neurol* 492(3): 349-69.
- Cebrián C and Prensa L (2010). Basal ganglia and thalamic input from neurons located within the ventral tier cell cluster region of the substantia nigra pars compacta in the rat. *J Comp Neurol* 518: 1283–300.
- Chandler DJ, Lamperski CS, Waterhouse BD (2013). Identification and distribution of projections from monoaminergic and cholinergic nuclei to functionally differentiated subregions of prefrontal cortex. *Brain Res* 1522: 38–58.
- Chaudhury D, Walsh JJ, Friedman AK, Juarez B, Ku SM, Koo JW, Ferguson D, Tsai H-C, Pomeranz L, Christoffel DJ, Nectow AR, Ekstrand M, Domingos A, Mazei-Robison MS, Mouzon E, Lobo MK, Neve RL, Friedman JM, Russo SJ, Deisseroth K, Nestler EJ, Han M-H (2013). Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* 493: 532–36.
- Chergui K, Akaoka H, Charléty PJ, Saunier CF, Buda M, Chouvet G (1994). Subthalamic nucleus modulates burst firing of nigral dopamine neurones via NMDA receptors. *Neuroreport* 5: 1185–88.
- Chuhma N, Mingote S, Moore H, Rayport S (2014). Dopamine neurons control striatal cholinergic neurons via regionally heterogeneous dopamine and glutamate signaling. *Neuron* 81, 901–12.
- Conrad LC, Leonard CM, Pfaff DW (1974). Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: An autoradiographic and degeneration study. *J. Comp. Neurol* 156 (2): 179-205.

- Conrad LC, Pfaff DW (1976a). Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J.Comp. Neurol* 169(2): 185-219.
- Conrad LC, Pfaff DW (1976b). Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. II. An autoradiographic study of the anterior hypothalamus. *J. Comp. Neurol* 169 (2): 221- 61.
- Cools R (2006). Dopaminergic modulation of cognitive function-implications for L-DOPA treatment in Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 30(1): 1-23.
- Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT (1990). Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain Res Bull* 25(2): 271-84.
- Corominas-Roso M, Roncero C, Bruguera E, Casas M (2007). The dopaminergic system and addictions. *Rev Neurol* 44(1): 23-31.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999). The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 122 (Pt 8): 1437-48.
- Dampney RAL (1994). Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev* 74: 323–64.
- Dahlström A, Fuxe K (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiologica Scandinavica* 62(232): 5-25.
- Del-Fava F, Hasue RH, Ferreira JGP, Shammah-Lagnado SJ (2007). Efferent connections of the rostral linear nucleus of the ventral tegmental area in the rat. *Neuroscience* 145(3): 1059–76.
- Dobi A, Margolis EB, Wang H-L, Harvey BK, Morales, M (2010). Glutamatergic and nonglutamatergic neurons of the ventral tegmental area establish local synaptic contacts with dopaminergic and nondopaminergic neurons. *J Neurosci* 30: 218–229.
- Domesick VB (1988). Neuroanatomical organization of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Ann N Y Acad Sci* 537: 10–26.
- Domesick VB, Stinus L, Paskevich PA (1983). The cytology of dopaminergic and nondopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat: a light- and electron-microscopic study. *Neuroscience* 8(4): 743-65.
- Deutch AY, Lee MC, Gillham MH, Cameron DA, Goldstein M, Iadarola MJ (1991). Stress selectively increases fos protein in dopamine neurons innervating the prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 1(4): 273–92.
- Eiler WJ, Seyoum R, Foster KL, Mailey C, June HL (2003). D1 dopamine receptor regulates alcohol-motivated behaviors in the bed nucleus of the stria terminalis in alcohol-preferring rats. *Synapse* 48(1): 45–56.
- Evans AH, Strafella AP, Weintraub D, Stacy M (2009). Impulsive and compulsive behaviors in Parkinson's disease. *Mov Disord* 24(11): 1561-70.

- Faget L, Osakada F, Duan J, Ressler R, Johnson AB, Proudfoot JA, Yoo JH, Callaway EM, Hnasko TS (2016). Afferent inputs to neurotransmitter-Defined Cell Types in the ventral tegmental area. *Cell Rep* 15(12): 2796-808.
- Fallon JH (1981). Collateralization of monoamine neurons: mesotelencephalic dopamine projections to caudate, septum, and frontal cortex. *J Neurosci* 1(12): 1361–68.
- Fallon JH, Hicks R, Loughlin SE (1983). The origin of cholecystokinin terminals in the basal forebrain of the rat: evidence from immunofluorescence and retrograde tracing. *Neurosci Lett* 37(1): 29-35.
- Fallon JH, Leslie FM, Cone RI (1985). Dynorphin-containing pathways in the substantia nigra and ventral tegmentum: a double labeling study using combined immunofluorescence and retrograde tracing. *Neuropeptides* 5(4-6): 457-60.
- Fallon JH, Moore RY (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 180(3): 545–80.
- Ferreira JG, Del-Fava F, Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (2008). Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience* 153(1): 196–213.
- Franklin KBJ and Paxinos G (2007). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, CA: Academic Press.
- Friedman A, Frankel M, Flaumenhaft Y, Merenlender A, Pinhasov A, Feder Y, Taler M, Gil-Ad I, Abeles M, Yadid G (2009). Programmed acute electrical stimulation of ventral tegmental area alleviates depressive-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 34(4): 1057–1066.
- Fu Y, Yuan Y, Halliday G, Rusznák Z, Watson C, and Paxinos G (2012). A cytoarchitectonic and chemoarchitectonic analysis of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area, and retrorubral field in the mouse. *Brain Struct Funct* 217: 591–612.
- Fuxe K (1965). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiol Scand Suppl* 247: 37+.
- Fuxe K, Hökfelt T, Johansson O, Jonsson G, Lidbrink P, Ljungdahl A (1974). The origin of the dopamine nerve terminals in limbic and frontal cortex. Evidence for meso-cortico dopamine neurons. *Brain Res* 82(2): 349-55.
- Furuta T, Tomioka R, Taki K, Nakamura K, Tamamaki N, Kaneko T (2001). In vivo transduction of central neurons using recombinant Sindbis virus: Golgi-like labeling of dendrites and axons with membrane-targeted fluorescent proteins. *J Histochem Cytochem* 49: 1497–508.
- Gao DM, Hoffman D, Benabid AL (1996). Simultaneous recording of spontaneous activities and nociceptive responses from neurons in the pars compacta of substantia nigra and in the lateral habenula. *Eur J Neurosci* 8: 1471–78.
- García-Amado Sancho M (2014). *El complejo amigdalino humano: arquitectura celular e innervación dopaminérgica* (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid).

- García-Amado M, Prensa L (2013). Distribution of dopamine transporter immunoreactive fibers in the human amygdaloid complex. *Eur J Neurosci* 38(11): 3589–601.
- Cerruti C, Walther DM, Kuhar MJ, Uhl GR (1993) Dopamine transporter mRNA expression is intense in rat midbrain neurons and modest outside midbrain. *Brain Res Mol Brain Res* 18: 181–186.
- Gauthier J, Parent M, Lévesque M, Parent A (1999). The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Res* 834(1-2): 228-32.
- Gaykema RP, Zaborszky L (1996). Direct catecholaminergic-cholinergic interactions in the basal forebrain. II. Substantia nigra-ventral tegmental area projections to cholinergic neurons. *J Comp Neurol* 374(4): 555-77.
- Gaykema RP, Zaborszky L (1997). Parvalbumin-containing neurons in the basal forebrain receive direct input from the substantia nigra-ventral tegmental area. *Brain Res* 747(1): 173-9.
- Geisler S, Derst C, Veh RW, Zahm DS (2007). Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci* 27(21): 5730–43.
- Geisler S, Marinelli M, Degarmo B, Becker ML, Freiman AJ, Beales M, Meredith GE, Zahm DS (2008). Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 33: 2688–700.
- Geisler S, Zahm DS (2005). Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J Comp Neurol* 490(3): 270–94.
- Georges F, Aston-Jones G. (2002). Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 22: 5173–87.
- Gerfen CR, Herkenham M, Thibault J (1987a). The Neostriatal Mosaic: II. Patch-and Matrix-Directed Mesostriatal Dopaminergic and Non-Dopaminergic Systems. *J Neurosci* 7(12): 3915-34.
- Gerfen CR, Baimbridge KG, Thibault J (1987b). The neostriatal mosaic: III. Biochemical and developmental dissociation of patch-matrix mesostriatal systems. *J Neurosci* 7 (12): 3935-44.
- German DC, Manaye KF, Sonsalla PK, Brooks BA (1992). Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease and MPTP-induced parkinsonism: sparing of calbindin-D28k-containing cells. *Ann N Y Acad Sci* 648: 42-62.
- Goghari VM, Sponheim SR, MacDonald AW 3<sup>rd</sup> (2010). The functional neuroanatomy of symptom dimensions in schizophrenia: a qualitative and quantitative review of a persistent question. *Neurosci Biobehav Rev* 34: 468-86.
- Gonçalves L, Sego C, Metzger M (2012). Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial tegmental nucleus and ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 520: 1278–300.
- Gonzalez-Hernandez T, Barroso-Chinea P, De La Cruz Muros I, Del Mar Perez-Delgado M, Rodriguez M (2004). Expression of dopamine and vesicular monoamine

- transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. *J Comp Neurol* 479: 198–215.
- Gorelova N, Mulholland PJ, Chandler J, and Seamans JK (2012). The glutamatergic component of the mesocortical pathway emanating from different subregions of the ventral midbrain. *Cereb Cortex* 22: 327–36.
- Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV (1996). The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? *Prog Brain Res* 107: 485–511.
- Grofova I, Deniau JM, Kitai ST (1982). Morphology of the substantia nigra pars reticulata projection neurons intracellularly labeled with HRP. *J Comp Neurol* 208(4): 352–68.
- Gruber C, Kahl A, Lebenheim L, Kowski A, Dittgen A, Veh RW (2007). Dopaminergic projections from the VTA substantially contribute to the mesohabenular pathway in the rat. *Neurosci Lett* 427 (3): 165–70.
- Guillery RW (1957). Degeneration in the hypothalamic connexions of the albino rat. *J Anat* 91(1): 91–115.
- Gunaydin LA, Grosenick L, Finkelstein JC, Kauvar IV, Fenno LE, Adhikari A, Lammel S, Mirzabekov JJ, Airan RD, Zalocusky KA, Tye K M, Anikeeva P, Malenka RC, Deisseroth K (2014). Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell* 157: 1535–51.
- Hall CW, Behbehani MM (1998). Synaptic effects of nitric oxide on enkephalinergic, GABAergic and glutamatergic networks of the rat periaqueductal gray. *Brain Res* 805: 69–87.
- Haber SN, Fudge JL (1997). The interface between dopamine neurons and the amygdala: implications for schizophrenia. *Schizophr Bull* 23(3):471–82.
- Halliday GM, Törk I (1984). Electron microscopic analysis of the mesencephalic ventromedial tegmentum in the cat. *J Comp Neurol* 230(3): 393–412.
- Halliday GM, Törk I (1986). Comparative anatomy of the ventromedial Mesencephalic tegmentum in the rat, cat, monkey and human. *J Comp Neurol* 252: 423–45.
- Hamill GS, Fass B (1984). Differential distribution of diagonal band afferents to subnuclei of the interpeduncular nucleus in rats. *Neurosci Lett* 48(1): 43–8.
- Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (2002). Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 454(1): 15–33.
- Herkenham M, Nauta WJ (1977). Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *P J Comp Neurol* 187(1): 19–47
- Hnasko TS, Hjelmstad GO, Fields HL, Edwards RH (2012). Ventral tegmental area glutamate neurons: electrophysiological properties and projections. *J Neurosci* 32(43): 15076–85.
- Hökfelt T, Johansson O, Goldstein M (1984). Chemical anatomy of the brain. *Science* 225 (4668): 1326–34.



- Hökfelt T, Kellertha JO, Nilssona G, Pernowa B (1975). Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Res* 100(2): 235-52.
- Hosp JA, Nolan HE, Luft AR (2015). Topography and collateralization of dopaminergic projections to primary motor cortex in rats. *Exp Brain Res* 233(5): 1365-75.
- Hosp JA, Luft AR (2013). Dopaminergic meso-cortical projections to M1: role in motor learning and motor cortex plasticity. *Front Neurol* 4: 145–52.
- Hosp JA, Pekanovic A, Rioult-Pedotti MS, Luft AR (2011). Dopaminergic projections from midbrain to primary motor cortex mediate motor skill learning. *J Neurosci* 31(7): 2481–87.
- Hong EY, Lee HS (2011). Retrograde study of projections from the tuberomammillary nucleus to the mesopontine cholinergic complex in the rat. *Brain Res* 1383: 169-78.
- Huang S, Paxinos G (1995). *Atlas of the Human Brainstem*. Academic Press, San Diego.
- Hur EE, Zaborszky L (2005). Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: a combined retrograde tracing in situ hybridization study [corrected]. *J Comp Neurol* 483(3): 351-73.
- Ikemoto S, Qin M, Liu ZH (2005). The functional divide for primary reinforcement of D-amphetamine lies between the medial and lateral ventral striatum: Is the division of the accumbens core, shell and olfactory tubercle valid? *J Neurosci* 25: 5061–65.
- Ikemoto S, Qin M, Liu ZH (2006). Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area. *J Neurosci* 26: 723–30.
- Ikemoto S (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 56: 27–78.
- Ikemoto S (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev* 35(2): 129-50.
- Jennings JH, Sparta DR, Stamatakis AM, Ung RL, Pleil KE, Kash TL, Stuber GD (2013). Distinct extended amygdala circuits for divergent motivational states. *Nature* 496: 224–28.
- Jeromin A, Yuan LL, Frick A, Pfaffinger P, Johnston D (2003). A modified Sindbis vector for prolonged gene expression in neurons. *J Neurophysiol* 90:2741–45.
- Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS (2009a). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: a structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol* 513: 566–96.
- Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009b). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61(5): 786–800.

- Jhou TC, Xu SP, Lee MR, Gallen CL, Ikemoto S (2012). Mapping of reinforcing and analgesic effects of the mu opioid agonist endomorphin-1 in the ventral midbrain of the rat. *Psychopharmacology* 224 (2): 303-12.
- Jimenez-Castellanos J, Graybiel AM (1987). Subdivisions of the dopamine-containing A8-A9-A10 complex identified by their differential mesostriatal innervation of striosomes and extrastriosomal matrix. *Neuroscience* 23(1): 223-42.
- Kabanova A, Pabst M, Lorkowski M, Braganza O, Boehlen A, Nikbakht N, Pothmann L, Vaswani AR, Musgrove R, Di Monte DA, Sauvage M, Beck H, Blaess S (2015). Function and developmental origin of a mesocortical inhibitory circuit. *Nat Neurosci* 18(6): 872-82.
- Kalivas PW. Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Rev* 18(1): 75-113.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 513: 597–621.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010a). Gamma-aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol Psychiat* 67: 88–92.
- Kaufling J, Waltisperger E, Bourdy R, Valera A, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010b). Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br J Pharmacol* 161: 1677–91.
- Karnovsky MJ, Roots L (1964). A “direct-coloring” thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 12: 219–21.
- Kawano M1, Kawasaki A, Sakata-Haga H, Fukui Y, Kawano H, Nogami H, Hisano S (2006). Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 498(5): 581-92.
- Kelley BJ, Duker AP, Chiu P (2012). Dopamine agonists and pathologic behaviors. *Parkinsons Dis* 2012: 603631.
- Kemali M (1977). The Interpeduncular Nucleus (ITP). Ultrastructure Data Indicative of a Possible Neurosecretory Activity. *Cell Tiss Res* 178: 83-96.
- Kirouac GJ1, Pittman QJ (2000). A projection from the ventral tegmental area to the periaqueductal gray involved in cardiovascular regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278 (6):R1643-50.
- Kirouac GJ, Li S, Mabrouk G (2004). GABAergic projection from the ventral tegmental area and substantia nigra to the periaqueductal gray region and the dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* 469 (2): 170–84.
- Korotkova TM, Ponomarenko AA, Brown RE, Haas HL (2004). Functional diversity of ventral midbrain dopamine and GABAergic neurons. *Mol Neurobiol* (3): 243-59.
- Kosaka K, Hiraiwa k (1915). Zur Anatomie der Sehnervenbahnen und ihrer Zentren. *Folia Neurobiol Bd.* 9: 367.

- Krawczyk M, Georges F, Sharma R, Mason X, Berthet A, Bézard E, Dumont EC (2011). Double-dissociation of the catecholaminergic modulation of synaptic transmission in the oval bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurophysiol* 105(1): 145–53.
- Kuramoto E, Furuta T, Nakamura KC, Unzai T, Hjoki H, Kaneko T (2009). Two types of thalamocortical projections from the motor thalamic nuclei of the rat: a single neuron- tracing study using viral vectors. *Cereb Cortex* 19: 2065–77.
- Lammel S, Hetzel A, Häckel O, Jones I, Liss B, Roeper J (2008). Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 57(5): 760–73.
- Lammel S, Lim BK, Malenka RC (2014). Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology* 76 Pt B: 351–59.
- Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K, Malenka RC (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491(7423): 212–17.
- Larsen JO, Gundersen HJ, Nielsen J (1998). Global spatial sampling with isotropic virtual planes: estimators of length density and total length in thick, arbitrarily orientated sections. *J Microsc* 191: 238–48.
- Laviolette SR (2007). Dopamine modulation of emotional processing in cortical and subcortical neural circuits: evidence for a final common pathway in schizophrenia? *Schizophr Bull* 33: 971–81.
- Laviolette SR, Alexson TO, van der Kooy D (2002). Lesions of the tegmental pedunculo-pontine nucleus block the rewarding effects and reveal the aversive effects of nicotine in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 22(19): 8653–60.
- Laviolette SR, Grace AA (2006). Cannabinoids potentiate emotional learning plasticity in neurons of the medial prefrontal cortex through basolateral amygdala inputs. *J Neurosci* 26(24): 6458–68.
- Lau BK, Vaughan CW (2014). Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. *Curr Opin Neurobiol* 29: 159–64.
- Lau CI, Wang HC, Hsu JL, Liu ME (2013). Does the dopamine hypothesis explain schizophrenia? *Rev Neurosci* 24(4): 389–400.
- Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Muntoni AL, Pistis M (2012). Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*, 37: 1164–76.
- Le Moal M, Simon H (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev* 71(1): 155–234.
- Lindvall O, Björklund A (1978). Anatomy of the dopaminergic neuron systems in the rat brain. *Adv Biochem Psychopharmacol* 19: 1–23.

- Lindvall O, Björklund A, Divac I (1977). Organization of mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex and septum. *Adv Biochem Psychopharmacol* 16: 39–46.
- Lindvall O, Björklund A, Divac I (1978). Organization of catecholamine neurons projecting to the frontal cortex in the rat. *Brain Res* 142(1): 1–24.
- Lindvall O, Björklund A, Moore RY, Stenevi U (1974). Mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex. *Brain Res* 81(2): 325–31.
- Lodge DJ, Grace AA (2006). The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(13): 5167–172.
- Loughlin SE, Fallon JH (1982). Mesostriatal projections from ventral tegmentum and dorsal raphe: cells project ipsilaterally or contralaterally but not bilaterally. *Neurosci Lett* 32(1): 11–6.
- Loughlin SE, Fallon JH (1984). Substantia nigra and ventral tegmental area projections to cortex: Topography and collateralization. *Neuroscience* 11 (2): 425–35.
- Lovick TA (1993). The periaqueductal gray-rostral medulla connection in the defence reaction: efferent pathways and descending control mechanisms. *Behav Brain Res* 58 (1-2): 19–25.
- Luo AH, Tahsili-Fahadan P, Wise RA, Lupica CR, Aston-Jones G (2011). Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science* 333(6040): 353–57.
- Ma QP, Zhou Y, Han JS (1993). Noxious stimulation accelerated the expression of c-fos protooncogene in cholecystokinergic and dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Peptides* 14: 561–66.
- Maeda H, Mogenson GJ (1981). Electrophysiological responses of neurons of the ventral tegmental area to electrical stimulation of amygdala and lateral septum. *Neuroscience* 6(3): 367–76.
- Mahler SV, Vazey EM, Beckley JT, Keistler CR, McGlinchey EM, Kaufling J, Wilson SP, Deisseroth K, Woodward JJ, Aston-Jones G (2014). Designer receptors show role for ventral pallidum input to ventral tegmental area in cocaine seeking. *Nat Neurosci* 17: 577–85.
- Matsuda W, Furuta T, Nakamura K C, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T (2009). Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci* 29: 444–53.
- Matsumoto M, Hikosaka O (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447(7148): 1111–5.
- McRitchie DA, Hardman CD, Halliday GM (1996). Cytoarchitectural distribution of calcium binding proteins in midbrain dopaminergic regions of rats and humans. *J Comp Neurol* 364(1): 121–50.

- Meibach RC, Siegel A (1977). Efferent connections of the septal area in the rat: an analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods. *Brain Res* 119(1): 1-20.
- Melis M, Camarini R, Ungless MA, Bonci A (2002). Long-lasting potentiation of GABAergic synapses in dopamine neurons after a single in vivo ethanol exposure. *J Neurosci* 22(6): 2074-82.
- Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL (1998). An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature* 395: 381-83.
- Milad MR, Vidal-Gonzalez I, Quirk GJ (2004). Electrical stimulation of the medial prefrontal cortex reduces conditioned fear in a temporally specific manner. *Behav Neurosci* 118: 389-94.
- Moore R, Bloom FE (1978). Central Catecholamine Neuron Systems: Anatomy and Physiology of the Dopamine Systems. *Annual Review of Neuroscience* 1: 129-69.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14(2-3): 69-97.
- Morales M, Margolis EB (2017). Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 18(2): 73-85.
- Morales M, Root DH (2014). Glutamate neurons within the midbrain dopamine regions. *Neuroscience* 282: 60-68.
- Mulder AH, Snyder SH (1976). Putative central neurotransmitters. In: *Molecular and functional neurobiology* (W.H. Gispen, ed.). 161-200: Elsevier.
- Nagai T, McGeer PL, McGeer EG (1983). Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat forebrain and midbrain. *J Comp Neurol* 218(2): 220-38.
- Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, and Ungless MA (2008). Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152: 1024-31.
- Nauta WJ (1956). An experimental study of the fornix system in the rat. *J Comp Neurol* 104(2): 247-71.
- Nauta WJ (1958). Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat. *Brain* 81(3): 319-40.
- Nauta WJ (1960). Limbic system and hypothalamus: anatomical aspects. *Physiol Rev Suppl* 4: 102-4.
- Nauta WJ, Smith GP, Faull RL, Domesick VB (1978). Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience* 3(4-5): 385-401.
- Nauta WJ, Whitlock DG (1956). Subcortical projections from the temporal neocortex in *Macaca mulatta*. *J Comp Neurol* 106(1): 183-212.
- Nestler EJ, Carlezon WA Jr (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 59(12): 1151-59.

- Nicola SM1, Deadwyler SA (2000). Firing rate of nucleus accumbens neurons is dopamine-dependent and reflects the timing of cocaine-seeking behavior in rats on a progressive ratio schedule of reinforcement. *J Neurosci* 20(14): 5526-37.
- Oades RD, Halliday GM (1987). Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434(2): 117–65.
- Oertel WH, Mugnaini E, Tappaz ML, Weise VK, Dahl AL, Schmechel DE, Kopin IJ (1982). Central GABAergic innervation of neurointermediate pituitary lobe: biochemical and immunocytochemical study in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(2): 675-79.
- Ohtori S, Takahashi K, Chiba T, Takahashi Y, Yamagata M, Sameda H, Moriya H (2000). Fos expression in the rat brain and spinal cord evoked by noxious stimulation to low back muscle and skin. *Spine* 25: 2425–30.
- Olszewski J, Baxter D (1954). *Cytoarchitecture of the Human Brain Stem*. Basel: Karger.
- Omelchenko N, Sesack SR (2009). Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. *Synapse* 63(10):895-906.
- Olson VG, Nestler EJ (2007). Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* 61: 87–95.
- Osborne PB, Vaughan CW, Wilson HI, Christie MJ (1996). Opioid inhibition of rat periaqueductal grey neurones with identified projections to rostral ventromedial medulla in vitro. *J Physiol* 490: 383–89.
- Ostergaard K, Holm IE, Zimmer J (1992). Tyrosine hydroxylase and acetylcholinesterase in the domestic pig mesencephalon: an immunocytochemical and histochemical study. *J Comp Neurol* 322(2): 149-66.
- Paxinos G, kus L, Ashwell KW, Watson C (1999). *Chemoarchitectonic atlas of the rat forebrain*. New York: Academic Press.
- Paxinos G, Watson C (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd Edn. Academic Press, San Diego.
- Paxinos G, Watson C (2007). *The Rat Nervous System in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Perrotti LI, Bolaños CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG, Wallace DL, Self DW, Nestler EJ, Barrot M (2005). DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* 21(10): 2817-24.
- Phillipson OT (1979a). The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of Tsai in the rat. *J Comp Neurol* 187(1): 85-98.
- Phillipson OT (1979b). A Golgi study of the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 187(1): 99-115.
- Phillipson OT (1979c). Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat. *J Comp Neurol* 187(1): 117-43.

- Pierce ET, Foote WE, Hobson JA (1976). The efferent connection of the nucleus raphe dorsalis. *Brain Res* 107(1):137-44.
- Pitchers KK, Coppens CM, Beloate LN, Fuller J, Van S, Frohmader KS, Laviolette SR, Lehman MN, Coolen LM (2014). Endogenous opioid-induced neuroplasticity of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area influences natural and opiate reward. *J Neurosci* 34(26): 8825-36.
- Poirier LJ, Guiguere M, Marchand R (1983). Comparative morphology of the substantia nigra and ventral tegmental area in the monkey, cat and rat. *Brain Res Bull* 11(3): 371-97.
- Porrero C, Rodríguez-Moreno J, Quetglas JI, Smerdou C, Furuta T, Clascá F (2016). A Simple and Efficient In Vivo Non-viral RNA Transfection Method for Labeling the Whole Axonal Tree of Individual Adult Long-Range Projection Neurons. *Front Neuroanat* 18; 10: 27.
- Prensa L, Parent A (2001). The nigrostriatal pathway in the rat: a single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. *J Neurosci* 21: 7247–60.
- Qi J, Zhang S, Wang H-L, Barker DJ, Miranda-Barrientos J, Morales M (2016). VTA glutamatergic inputs to nucleus accumbens drive aversion by acting on GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* 19: 725–33.
- Qi J, Zhang S, Wang H-L, Wang H, De Jesus Aceves Buendia J, Hoffman AF, Lupica CR, Seal RP, Morales M (2014). A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons. *Nat Commun* 5: 5390.
- Ranaldi R (2014). Dopamine and reward seeking: the role of ventral tegmental area. *Rev Neurosci* 25(5): 621-30.
- Rasband WS (1997–2012) ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Ray NJ, Miyasaki JM, Zurowski M, Ko JH, Cho SS, Pellecchia G, Antonelli F, Houle S, Lang AE, Strafella AP (2012). Extrastriatal dopaminergic abnormalities of DA homeostasis in Parkinson's patients with medication-induced pathological gambling: a [11C] FLB-457 and PET study. *Neurobiol Dis* 48(3): 519-25.
- Reinoso Suárez F, Llamas A (1968). Oral tegment of the ascending reticular pathways of the pons in mice. *Acta Neurol Latinoam* 14(1): 5-16.
- Reichling DB, Basbaum AI (1990). Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls: II. Electron microscopic immunocytochemical evidence of GABAergic control over the projection from the periaqueductal gray to the nucleus raphe magnus in the rat. *J Comp Neurol* 302: 378–393.
- Reyes S, Cottam V, Kirik D, Double KL, Halliday GM (2013). Variability in neuronal expression of dopamine receptors and transporters in the substantia nigra. *Mov Disord* 28(10):1351-9.

- Rodríguez-López C, Clascá F, Prensa L (2017). The Mesoaccumbens Pathway: A Retrograde Labeling and Single-Cell Axon Tracing Analysis in the Mouse. *Front Neuroanat* 11:25.
- Root DH, Mejias-Aponte CA, Qi J, Morales M (2014a). Role of glutamatergic projections from ventral tegmental area to lateral habenula in aversive conditioning. *J Neurosci* 34: 13906–10.
- Root DH, Mejias-Aponte CA, Zhang S, Wang H-L, Hoffman AF., Lupica CR, Morales M (2014b). Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat. Neurosci* 17, 1543–51.
- Rosenkranz JA, Grace AA (2002). Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *J Neurosci* 22: 324–37.
- Roychowdhury SM, Fields HL (1996). Endogenous opioids acting at a medullary mu-opioid receptor contribute to the behavioral antinociception produced by GABA antagonism in the midbrain periaqueductal gray. *Neuroscience* 74: 863–72.
- Russo SJ, Nestler EJ (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci* 14(9): 609–625.
- Saavedra JM, Brownstein M, Palkovits M (1974). Serotonin distribution in the limbic system of the rat. *Brain Res* 79(3): 437–41.
- Salamone JD, Correa M (2002). Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav Brain Res* 137(1-2): 3-25.
- Saper CB, Swanson LW, Cowan WM (1976). The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol* 169(4):409-42.
- Saper CB, Swanson LW, Cowan WM (1979). An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. *J Comp Neurol* 183(4): 689-706.
- Scammell TE1, Estabrooke IV, McCarthy MT, Chemelli RM, Yanagisawa M, Miller MS, Saper CB (2000). Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. *J Neurosci* 20(22): 8620-8.
- Scheibner T, Törk I (1987). Ventromedial mesencephalic tegmental (VMT) projections to ten functionally different cortical areas in the cat: topography and quantitative analysis. *J Comp Neurol* 259(2): 247–65.
- Shu SY, Ju G, Fan LZ (1988). The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 85: 169–71.
- Schultz W (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80 (1): 1–27.
- Seroogy KB, Mehta A, Fallon JH (1987). Neurotensin and cholecystokinin coexistence within neurons of the ventral mesencephalon: projections to forebrain. *Exp Brain Res* 68(2): 277-89.



- Sesack SR, Carr DB (2002). Selective prefrontal cortex inputs to dopamine cells: implications for schizophrenia. *Physiol Behav* 77: 513-7.
- Sesack SR1, Grace AA (2010). Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* 35(1): 27-47.
- Shimada S, Kitayama S, Walther D, Uhl G (1992). Dopamine transporter mRNA: dense expression in ventral midbrain neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 13:359–362.
- Simon H, Le Moal M, Calas A (1979). Efferents and afferents of the ventral tegmental-A10 region studied after local injection of [3H] leucine and horseradish peroxidase. *Brain Res* 178(1): 17–40.
- Skagerberg G, Lindvall O, Björklund A (1984). Origin, course and termination of the mesohabenular dopamine pathway in the rat. *Brain Res* 307(1-2): 99–108.
- Smith WJ, Stewart J, Pfaus JG (1997). Tail pinch induces fos immunoreactivity within several regions of the male brain: effects of age. *Physiol Behav* 61: 717–23.
- Sotomayor R, Forray MI, Gysling K (2005). Acute morphine administration increases extracellular DA levels in the rat lateral septum by decreasing the GABAergic inhibitory tone in the ventral tegmental area. *J Neurosci Res* 81(1): 132–39.
- Spanagel R, Weiss F (1999). The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci* 22(11): 521-7.
- Stamatakis AM, Jennings JH, Ung RL, Blair GA, Weinberg RJ, Neve RL, Boyce F, Mattis J, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Stuber GD (2013). A unique population of ventral tegmental area neurons inhibits the lateral habenula to promote reward. *Neuron* 80(4): 1039-53.
- Stamatakis AM, Stuber GD (2012). Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat Neurosci* 15(8): 1105-7.
- Stuber GD, Hnasko TS, Britt JP, Edwards RH, Bonci A (2010). Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. *J Neurosci* 30: 8229–33.
- Swanson LW (1976). An autoradiographic study of the efferent connections of the preoptic region in the rat. *J Comp Neurol* 167(2): 227-56.
- Swanson LW (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* 9: 321–53.
- Swanson LW, Cowan WM (1979). The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol*; 186(4): 621-55.
- Swanson LW, Mogenson GJ (1981). Neural mechanisms for the functional coupling of autonomic, endocrine and somatomotor responses in adaptive behavior. *Brain Res* 228(1):1-34.
- Sul JH, Jo S, Lee D, Jung MW (2011). Role of rodent secondary motor cortex in value-based action selection. *Nat Neurosci* 14(9):1202–1208. Erratum in (2013) *Nat Neurosci* 16(12): 1906.

- Sun M-K (1995). Central neural organization and control of sympathetic nervous system in mammals. *Prog Neurobiol* 47: 157–233.
- Taber E (1961). The Cytoarchitecture of the brain stem of the cat. I. Brain stem nuclei of the cat. *J Comp Neurol* 116: 27–69.
- Tan KR, Brown M, Labouebe G, Yvon C, Creton C, Fritschy JM, Rudolph U, Luscher C (2010). Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. *Nature* 463(7282): 769–74.
- Tan KR, Yvon C, Turiault M, Mirzabekov JJ, Doehner J, Labouèbe G, Deisseroth K, Tye KM, Luscher C (2012). GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron* 73: 1173–83.
- Tank AW, Curella P, Ham L (1986). Induction of mRNA for tyrosine hydroxylase by cyclic AMP and glucocorticoids in a rat pheochromocytoma cell line: evidence for the regulation of tyrosine hydroxylase synthesis by multiple mechanisms in cells exposed to elevated levels of both inducing agents. *Mol Pharmacol* 30(5): 497–503.
- Tsai C (1925). The Optic Tracts and Centers of the Opossum, *Didelphis Virginiana*. *J Comp Neurol* 39(2): 173–215.
- Taylor SR, Badurek S, Dileone RJ, Nashmi R, Minichiello L, Picciotto MR (2014). GABAergic and glutamatergic efferents of the mouse ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 522(14): 3308–34.
- Tecuapetla F, Patel JC, Xenias H, English D, Tadros I, Shah F, Berlin J, Deisseroth K, Rice ME, Tepper JM, Koos T (2010). Glutamatergic signaling by mesolimbic dopamine neurons in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 30, 7105–10.
- Tong ZY, Overton PG, Clark D (1996). Antagonism of NMDA receptors but not AMPA/kainate receptors blocks bursting in dopaminergic neurons induced by electrical stimulation of the prefrontal cortex. *J Neural Transm* 103: 889–904.
- Tolu S, Eddine R, Marti F, David V, Graupner M, Pons S, Baudonnat M, Husson M, Besson M, Reperant C, Zemdegs J, Pages C, Hay YA, Lambolez B, Caboche J, Gutkin B, Gardier AM, Changeux JP, Faure P, Maskos U (2013). Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Molecular psychiatry* 18(3): 382–93.
- Tork I, Halliday G, Scheibner T, Turner S (1984). The organization of the mesencephalic ventromedial (VMT) in the cat. In Bandler (Ed), *Modulation of sensorimotor activity during alterations in Behavioural States*, Alan Liss, New York, 39–73.
- Tripathi A, Prensa L, Cebrián C, Mengual E (2010). Axonal branching patterns of nucleus accumbens neurons in the rat. *J Comp Neurol* 518(22): 4649–73.
- Tripathi A, Prensa L, Mengual E (2013). Axonal branching patterns of ventral pallidal neurons in the rat. *Brain Struct Funct* 218(5): 1133–57.
- Tritsch NX, Ding JB, Sabatini BL (2012). Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature* 490: 262–66.

- Tsai C (1925). The optic tracts and centers of the Opossum, *Didelphis Virginiana*. *J Comp Neurol* 39 (2): 173-215.
- Tsai C-T (1989). Involvement of serotonin in mediation of inhibition of substantia nigra neurons by noxious stimuli. *Brain Res Bull* 22: 121–27.
- Tsai C-T, Nakamura S, Iwana K (1980). Inhibition of neuronal activity of the substantia nigra by noxious stimuli and its modification by the caudate nucleus. *Brain Res* 195: 299–311.
- Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai H-C, Finkelstein J, Kim S-Y, Adhikari A, Thompson KR, Andalman AS, Gunaydin LA, Witten IB, Deisseroth K (2013). Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature* 493: 537–41.
- Tzschentke TM (2001). Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Prog Neurobiol* 63: 241–320.
- Ungerstedt U (1971). Stereotaxic mapping of monoamine pathways in the rat brain. *Acta physiol* 367: 1–48.
- Ungless MA (2004). Dopamine: the salient issue. *Trends Neurosci* 27(12): 702– 706.
- Van Bockstaele EJ, Pickel VM (1995). GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain Res* 682: 215-21.
- Van Zessen R, Phillips JL, Budygin EA, Stuber GD (2012). Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption. *Neuron* 73: 1184–94.
- Veening JG, Cornelissen FM, Lieven PA (1980). The topical organization of the afferents to the caudatoputamen of the rat. A horseradish peroxidase study. *Neuroscience* 5(7): 1253-68.
- Wang H-L, Qi J, Zhang S, Wang H, Morales M (2015). Rewarding Effects of Optical Stimulation of Ventral Tegmental Area Glutamatergic Neurons. *J Neurosci* 35: 15948–54.
- Watabe-Uchida M, Zhu L, Ogawa SK, Vamanrao A, Uchida N (2012). Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron* 74: 858–73.
- Williams FG, Beitz AJ (1990). Ultrastructural morphometric analysis of GABA-immunoreactive terminals in the ventrocaudal periaqueductal grey: analysis of the relationship of GABA terminals and the GABA A receptor to periaqueductal grey-raphe magnus projection neurons. *J Neurocytol* 19: 686–96.
- Williams SM, Goldman-Rakic PS (1998). Widespread origin of the primate mesofrontal dopamine system. *Cereb Cortex* 8(4): 321–45.
- Wise RA (1978). Catecholamine theories of reward: a critical review. *Brain Res* 152(2): 215–47.
- Wise RA (2002). Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 36(2): 229–240.
- Wise RA (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5 (6): 483-94.

- Wise RA (2009). Roles for nigrostriatal—not just mesocorticolimbic—dopamine in reward and addiction. *Trends Neurosci* 32(10): 517–24.
- Wolf G, Sutin J (1966). Fiber degeneration after lateral hypothalamic lesions in the rat. *J Comp Neurol* 127(2): 137-56.
- Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ (2004). Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* 47(Suppl 1): 61–79.
- Yamaguchi T, Qi J, Wang HL, Zhang S, Morales M (2015). Glutamatergic and dopaminergic neurons in the mouse ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 41(6):760-72.
- Yamaguchi T, Sheen W, Morales M (2007). Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 25(1): 106-18.
- Yamaguchi T, Wang HL, Li X, Ng TH, Morales M (2011). Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. *J Neurosci* 31: 8476–90.
- Yetnikoff L, Lavezzi HN, Reichard RA, Zahm DS (2014). An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience* 282: 23–48.
- Zangen A, Ikemoto S, Zadina JE, Wise RA (2002). Rewarding and psychomotor stimulant effects of endomorphin-1: Anteroposterior differences within the ventral tegmental area and lack of effect in nucleus accumbens. *J Neurosci* 22: 7225–33.
- Zangen A, Solinas M, Ikemoto S, Goldberg SR, Wise RA (2006). Two brain sites for cannabinoid reward. *J Neurosci* 26: 4901–07.
- Zahm DS (2000). An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav Rev* 24(1): 85-105.
- Zahm DS, Heimer L (1993). Specificity in the efferent projections of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell. *J Comp Neurol* 327(2): 220-32.
- Zahm DS, Williams EA, Latimer MP, Winn P (2001). Ventral mesopontine projections of the caudomedial shell of the nucleus accumbens and extended amygdala in the rat: double dissociation by organization and development. *J Comp Neurol* 436(1): 111–25.
- Zhang S, Qi J, Li X, Wang HL, Britt JP, Hoffman AF, Bonci A, Lupica CR, Morales M (2015). Dopaminergic and glutamatergic microdomains in a subset of rodent mesoaccumbens axons. *Nat Neurosci* 18(3): 386-92.
- Zweifel LS, Argilli E, Bonci A, Palmiter RD (2008). Role of NMDA receptors in dopamine neurons for plasticity and addictive behaviors. *Neuron* 59: 486–96.